

Aus dem
Veterinär - Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

der Klinik für Kleintiere
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Morphologische und klinische Untersuchungen zur experimentellen Denervation des Ellbogengelenks beim Hund

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Jenny Fischer
aus Idar - Oberstein

Leipzig, 2012

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. med. vet. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Johannes Seeger
Prof. Dr. med. vet. Peter Böttcher

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Johannes Seeger
Veterinär-Anatomisches Institut
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 41
04103 Leipzig

Prof. Dr. med. vet. Peter Böttcher
Klinik für Kleintiere
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 23
04103 Leipzig

Prof. Dr. med. vet. Carsten Staszyk
Anatomisches Institut
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover

Tag der Verteidigung: 13.03.2012

*Gewidmet meinen Eltern, meinem Opa,
und meinem Freund*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Morphologie und Innervation des Ellbogengelenks.....	3
2.1.1	Anatomischer Gelenkaufbau.....	3
2.1.2	Histologie des Ellbogengelenks.....	3
2.1.3	Innervation der Gelenkkapsel des Ellbogengelenks.....	4
2.2	Osteoarthrose.....	5
2.2.1	Ätiologie und Pathogenese.....	5
2.2.2	Cubarthrose beim Hund.....	7
2.2.3	Schmerzentstehung und Verarbeitung.....	10
2.2.3.1	Schmerz bei Osteoarthrose.....	13
2.3	Therapiemöglichkeiten der Osteoarthrose.....	16
2.3.1	Konservative Möglichkeiten.....	16
2.3.1.1	Gewichtsreduktion.....	16
2.3.1.2	Nicht- steroidale Entzündungshemmer.....	16
2.3.1.3	Physiotherapie und Reizstrom.....	18
2.3.1.4	Nutrazeuticals.....	20
2.3.1.5	Hyaluronsäure.....	22
2.3.1.6	Strahlentherapie.....	22
2.3.2	Operative Möglichkeiten.....	23
2.3.2.1	Endoprothese.....	23
2.3.2.2	Denervation.....	24
2.3.2.2.1	Chirurgisch.....	24
2.3.2.2.2	Saporin.....	25
	Definition und Vorkommen.....	25
	Ribosomen- inaktivierende Proteine.....	25
	Wirkungsweise.....	25
	OX7- Saporin.....	26
	Fluoro- Gold.....	27
2.3.2.2.3	Capsaicin.....	28
	Definition und Wirkungsweise.....	28
	Klinische Relevanz.....	29
2.3.2.2.4	Botox.....	30
	Definition und Wirkungsweise.....	30
	Klinische Relevanz.....	30

3	Tiere, Material und Methoden.....	32
3.1	OX7-Saporin- Injektion.....	32
3.1.1	Versuchstiere und ihre Haltung.....	32
3.1.2	Versuchsdurchführung.....	33
3.1.3	Histologische Untersuchungen.....	35
3.1.4	Material, Chemikalien, Geräte.....	41
3.2	Capsaicin- Injektion.....	42
3.2.1	Tiere und deren klinische Befunde.....	42
3.2.2	Durchführung der Behandlung.....	43
3.2.3	Wirkstoffe.....	44
3.3	Botox- Injektion.....	44
3.3.1	Tiere und deren klinische Befunde.....	44
3.3.2	Durchführung der Behandlung.....	46
3.3.3	Wirkstoffe.....	46
4	Ergebnisse.....	47
4.1	OX7-Saporin- Injektion.....	47
4.1.1	Histologische Auswertung der Präparate.....	47
4.1.2	Ergebnisse der klinischen Untersuchungen.....	51
4.2	Capsaicin- Injektion.....	52
4.3	Botox- Injektion.....	55
5	Diskussion.....	61
5.1	OX7- Saporin Injektion.....	62
5.1.1	Sensible Innervation des Ellbogengelenks beim Hund und Bestimmung der Gesamtanzahl der Neurone in den Ganglien C4-Th3.....	62
5.1.2	Kritik des experimentellen Versuchsansatzes.....	63
5.1.2.1	Quantitative Analyse der Präparate mit dem „Improvision- Imaging- Systems“.....	63
5.1.2.2	Markierung von Gelenkafferenzen mittels Fluoro-Gold.....	64
5.1.2.3	Denervation des caninen Ellbogengelenks mit OX7-Saporin.....	67
5.1.3	Klinische Ergebnisse des Versuches.....	69
5.1.4	Schlussfolgerungen.....	71
5.2	Capsaicin- Injektion.....	71
5.3	Botox- Injektion.....	74
5.4	Chemische Denervation im Gelenk beim Hund – Schlussfolgerung.....	76
6	Zusammenfassung.....	78

7	Summary.....	80
8	Literaturverzeichnis.....	82
9	Danksagung.....	100

Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Art.	Articulatio
ATP	Adenosintriphosphat
BTA	Botulinumtoxin A
C 4 – C 8	Zervikalganglion 4 – Zervikalganglion 8
CGRP	Calcitonin-gene-related-peptid
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
DHA	Docosahexaensäure
ED	Ellbogendysplasie
EKG	Elektrokardiogramm
EPA	Eicosapentaensäure
FCP	Fragmentierter Processus coronoideus medialis ulnae
FG	Fluoro-Gold
HBO	Quecksilberdampflampe
HS	Hyaluronsäure
IEWG	International Elbow Working Group
IPA	Isolierter Proc. anconaeus
kDa	Kilo Dalton
KM	Körpermasse
L 4	Lumbalganglion 4
Lig.	Ligamentum
MHz	Mega-Hertz
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
N.	Nervus
n.a.	nicht auswertbar
NaCl	Natrium-Chlorid
NAF	Natriumfluorid (Glykolysehemmer)
NSAID	Nicht steroidale Antiphlogistika
OA	Osteoarthrose
OCD	Osteochondrosis dissecans des Condylus medialis humeri
PGE2	Prostaglandin E2
PLA2	Phospholipase 2
Proc.	Processus
RIP	Ribosomen- inaktivierende Proteine
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

SP	Substanz P
Tab.	Tabelle
TENS	Transkutane elektrische Nervenstimulation
Th 1 – Th 3	Thorakalganglion 1 – Thorakalganglion 3
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die Osteoarthritis (OA) ist eine der am häufigsten vorkommenden Erkrankungen beim Hund. Schätzungen zufolge leiden mehr als 20% der erwachsenen Hunde an Arthritis (JOHNSTON 1997). Dabei ist das Ellbogengelenk des Hundes sehr häufig von Arthritis betroffen, welche sich meist sekundär durch eine Ellbogendysplasie (ED) entwickelt (INNES 2010). In der Folge entstehen chronische, progressive Lahmheiten.

Da die OA nicht heilbar ist (SANDERSON et al. 2009), ist das Ziel einer Behandlung vor allem Schmerzfreiheit, bzw. eine deutliche Schmerzreduktion, um eine akzeptable Lebensqualität aufrecht zu erhalten und das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen (MILLIS 2002). Im Ellbogengelenk ist dies derzeit durch Medikamente in Form von nicht steroidal entzündungshemmenden (NSAIDs), Physiotherapie und weiteren begleitenden Maßnahmen wie z.B. Gewichtsreduktion möglich. Weitere konservative Maßnahmen wie beispielsweise die Physiotherapie sind zur begleitenden Therapie gut geeignet, erreichen aber allein keine ausreichende Schmerzreduktion. Eine weitere Möglichkeit stellt der Einsatz einer Endoprothese dar, der allerdings in diesem Gelenk mit sehr starken Komplikationen behaftet ist.

Die chirurgische Denervation zur Behandlung osteoarthrotischer Schmerzen wird beim Hund bisher erfolgreich am Hüftgelenk durchgeführt (KINZEL et al. 2002). Ein entsprechender Eingriff ist für das Ellbogengelenk bisher nicht beschrieben worden. Die sensible Innervation der Gelenkkapsel des Ellbogengelenks wird zum einen von direkten *Rami articulares* der Gliedmaßenerven übernommen, die sich in der Kapsel verzweigen. Zum anderen sind Nervenfasern beteiligt, die Muskelmassen durchlaufen oder vom Periost aus auf die Gelenkkapsel übertreten (STASZYK und GASSE 1999). Somit nimmt ein Großteil der sensiblen Innervation ihren Ursprung in der Umgebung des Gelenkes. Daher scheint es kaum möglich, diese Nervenversorgung mit einem vertretbaren Maß an operativem Trauma gezielt zu zerstören (BÖTTCHER und GREVEL 2008). BUDER (2005) hat nachgewiesen, dass eine Denervation zur Behandlung osteoarthrotischer Schmerzen auch im Ellbogengelenk des Hundes prinzipiell funktioniert. Dabei kam es in 83% der Fälle nach intraartikulärer Applikation von Xylocain zu einer deutlichen Reduktion der Lahmheiten.

Eine Denervation bzw. Betäubung des arthrotischen Gelenkes scheint auch durch die intraartikuläre Applikation von Botox oder Capsaicin beim Menschen möglich zu sein (CANTILLON et al. 2005; MAHOWALD et al. 2006). Da diese Wirkung sowohl von Xylocain als auch die von Botox oder Capsaicin keine dauerhafte ist, ist es sehr wichtig, eine permanente irreversible Denervation zu erreichen.

Durch die intraartikuläre Applikation von OX7-Saporin ist dies, zumindest bei der Ratte möglich (SALO et al. 1997). Diese Art der chemischen Denervation könnte auch bei der Therapie der Ellbogenarthrose beim Hund Anwendung finden. Saporin ist ein äußerst potentes Ribosomen- inaktivierendes Protein (RIP), welches aus der Pflanze *Saponaria officinalis* gewonnen wird (WILEY und KLINE 2000). Da Saporin aktiv über Endozytose in die Zelle aufgenommen werden muss und selbst über keine intrinsische Bindungsaktivität verfügt, ist eine Verbindung mit einem Antikörper notwendig. Meist wurde OX7 als Antikörper verwendet, der an alle Zellen mit dem Oberflächen- Glykoprotein Thy1 bindet. Bei der Ratte

wird Thy1 von neuronalen Strukturen und T-Lymphozyten exprimiert (MORRIS et al. 1980, MORRIS und RITTER 1980). Beim Hund tragen neben neuronalen Strukturen auch Zellen aus dem Stütz- und Bindegewebe das Thy1- Oberflächen- Glykoprotein (DALCHAU und FABRE 1979a, 1979b, MCKENZIE und FABRE 1981). Ziel einer intraartikulären Injektion von OX7-Saporin ist die möglichst umfassende und dauerhafte Abtötung aller Nervenendigungen im Bereich der Synovialmembran und Gelenkkapsel. Somit sind nur die sensiblen Nerven betroffen. Motorische Fasern ziehen außen am Gelenk vorbei. Bei der Ratte konnte nach der Injektion von OX7-Saporin in das Kniegelenk eine Reduktion der das Kniegelenk versorgenden spezifischen Gelenkafferenzen der Dorsalganglienzellen um 88 % festgestellt werden (SALO et al. 1997).

Bezüglich der Anwendung von OX7-Saporin beim Hund liegen keine Informationen vor.

Deshalb wurden erstmalig folgende experimentelle und klinische Ansätze einer chemischen Denervation des Ellbogengelenks beim Hund zur Therapie der OA getestet:

1. Eine intraartikuläre Injektion von OX7- Saporin beim Hund zu etablieren. Die Wirksamkeit des neuronalen Zellgiftes sollte durch die Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoro- Gold (FG) in das Ellbogengelenk geprüft werden.
2. Die intraartikuläre Injektion von Capsaicin in das Ellbogengelenk klinisch an OA erkrankter Hunde,
3. Die intraartikuläre Injektion von Botulinumtoxin in das Ellbogengelenk klinisch an OA erkrankter Hunde.

2 Literaturübersicht

2.1 Morphologie und Innervation des Ellbogengelenks

2.1.1 Anatomischer Gelenkaufbau

Das Ellbogengelenk ist ein zusammengesetztes Scharniergelenk. Es wird gebildet von dem distalen Teil des Humerus, *Condylus humeri*, der *Fovea capitis radii* und der *Incisura trochlearis ulnae* (SALOMON et al. 2008). Beim Hund wird der Humerus sowohl vom Radius, als auch von der Ulna von distal gestützt (NICKEL et al. 1992). Man unterscheidet drei Teilgelenke, die *Articulatio (Art.) radioulnaris proximalis*, die *Art. humeroradialis* und die *Art. humeroulnaris* (NICKEL et al. 1992). Die Gelenkkapsel, *Capsula articularis*, inseriert an den Gelenkrändern und schließt alle drei Teilgelenke mit ein. Schräg nach mediodistal verlaufende Fasern verstärken die Kapsel an der Beugeseite (NICKEL et al. 1992). Die *Art. humero-ulnaris* hat stabilisierende Aufgaben und begrenzt die Streckbewegungen. Das proximale Radioulnargelenk ermöglicht beim Hund die Rotationsbewegung des Antebrachiums. Seitwärtsbewegungen sind im Ellbogengelenk durch die straffen Seitenbänder, die Führungskämme und -rinnen und den, in die *Fossa olecrani* ragenden *Processus (Proc.) anconaeus* des Olecranon stark eingeschränkt (SALOMON et al. 2008). Zu den Bändern des Ellbogengelenks gehört das *Ligamentum (Lig.) collaterale cubiti laterale*, das *Lig. collaterale cubiti mediale* und das *Lig. olecrani*, welches eng mit der Gelenkkapsel verbunden ist (NICKEL et al. 1992). Die *Membrana interossea antebrachii*, das *Lig. interosseum antebrachii*, das *Lig. anulare radii* und das *Lig. radioulnare* verbinden die Unterarmknochen miteinander (SALOMON et al. 2008).

2.1.2 Histologie des Ellbogengelenks

Das Ellbogengelenk gehört histologisch zu den „echten“ Gelenken. Diese sind gekennzeichnet durch einen Gelenkspalt, knorpelbedeckte Gelenkflächen, eine Gelenkhöhle, eine allseitig geschlossene Gelenkkapsel, einen Bandapparat und die Muskulatur (BERG und KOCH 1992). Bei dem, im Gelenk vorkommenden Knorpel, handelt es sich um hyalinen Knorpel (LIEBICH 2010). Gelenkknorpel ist im Allgemeinen gefäßlos und enthält keine Nerven. Die Ernährung erfolgt durch Diffusion von Flüssigkeit und Nährstoffen aus dem umgebenden Gewebe und durch die Synovialflüssigkeit (LIEBICH 2010). Hyaliner Knorpel zeichnet sich durch ein hohes Maß an Druckelastizität aus, ist stoßdämpfend elastisch und dennoch von fester Konsistenz. Reifes Knorpelgewebe kann sich funktionell kaum regenerieren, so dass bindegewebige Narben in Form von Faserknorpel entstehen (LIEBICH 2010).

Hyaliner Knorpel besteht aus knorpelbildenden Zellen, Chondroblasten, welche die Knorpelgrundsubstanz produzieren. Die Zellen weichen mit zunehmender Matrix auseinander und differenzieren sich zu abgeplatteten, randständigen Chondrozyten (LIEBICH 2010). Die Knorpelgrundsubstanz besteht überwiegend aus Wasser (70%), aus kollagenen Fasern Typ II und aus Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure und Proteoglykanen) (LIEBICH 2010). Proteoglykane haben eine hohe

Wasserbindungskapazität, was zusätzlich die Verformbarkeit und die Elastizität des Knorpels erhöht (STOCKWELL 1979). Seine glatte Oberfläche erlaubt eine fast reibungslose Bewegung und kompensiert Druck und Scherkräfte, die auf den subchondralen Knochen wirken (POOLE 1993). Die Dicke des Gelenkknorpels variiert und ist von der jeweiligen Belastung abhängig (SCHÜNKE 2001). Um den mechanischen Belastungen gerecht zu werden, sind die Kollagenfibrillen arkadenförmig angeordnet und haben somit eine hohe Zug und Reißfestigkeit. Die Proteoglykane sind in diese Komplexe integriert (LIEBICH 2010). SCHÜNKE (2001) unterscheidet 19 Kollagentypen. Diese unterscheiden sich durch die Kombination und die Modifikation der verschiedenen Alphaketten in der Tripelhelix (WILLIAMS et al. 1997). Die Chondroblasten synthetisieren Kollagentyp II, welches aus 3 identischen Alpha-1- Ketten besteht. Der Anteil der Kollagentyp II Fasern in der Matrix variiert nach Literaturangaben zwischen 50% (SCHULZ und DÄMMRICH 1991) und 95% (PETRIDES 1997) und ist für die Stabilität im Gelenkknorpel verantwortlich (HULLAND 1993).

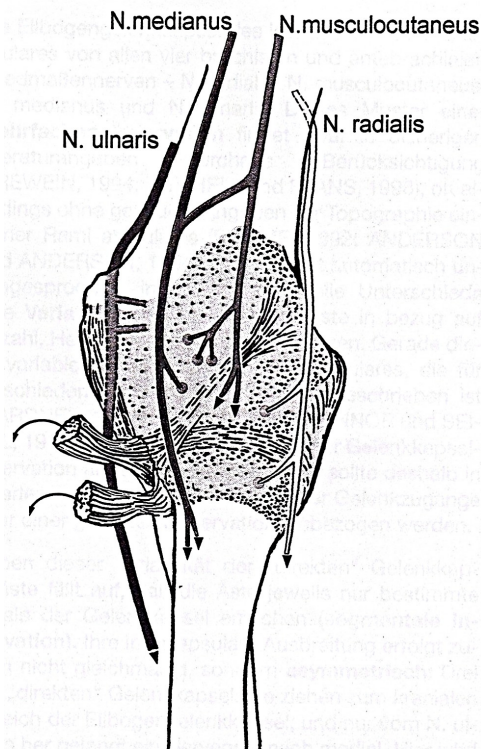
2.1.3 Innervation der Gelenkkapsel des Ellbogengelenks

Die Angaben zur Innervation der Gelenkkapsel des Ellbogengelenks stützen sich, falls nicht anders angegeben, auf Angaben von STASZYK und GASSE (1999).

An der Innervation der Gelenkkapsel des Ellbogengelenks sind zum einen *Rami articulares* des *Nervus(N.) radialis*, des *N. musculocutaneus*, des *N. medianus* und des *N. ulnaris*, zum anderen muskuläre und periostale Nervenfasern beteiligt. Die beteiligten Rückenmarkssegmente, aus denen die jeweiligen Nerven entspringen, liegen zwischen C6 und Th2 (SALOMON et al. 2008).

Vom *Ramus profundus* des *N. radialis*, der aus den Segmenten C7-Th2 entspringt (SALOMON et al. 2008), treten ein bis zwei *Rami articulares* proximal oder distal des *Lig. anulare* in die Gelenkkapselwand ein. Der *N. musculocutaneus* entspringt aus den Segmenten C6 – C8 (SALOMON et al. 2008) und entlässt in der Regel nur einen Gelenkkapselast, der sich in zwei oder drei sekundäre Äste aufteilt, welche dann kranial in die Ellbogengelenkkapsel eintreten. Der *N. medianus* kommt aus den Segmenten C8 – Th2 (SALOMON et al. 2008). Von ihm reicht lediglich ein Gelenkkapselast in den kranialen Bereich der Ellbogengelenkkapsel. Die ein bis zwei *Rami articulares* des *N. ulnaris* sind an der Innervation der medialen Ausbuchtung der Kapsel beteiligt. Dieser Nerv entspringt den Segmenten C8 – Th2 (SALOMON et al. 2008). An den genannten Eintrittsstellen entspringen dann intrakapsulär Aufzweigungen, die sich dann mehr oder weniger radiär ausbreiten. Somit werden nur der kraniale und mediale Abschnitt des Ellbogengelenks größtenteils von „direkten“, d.h. von Nervenfasern aus den passierenden Gliedmaßenerven, erreicht. Der laterale und kaudale Teil der Ellbogengelenkkapsel werden ausschließlich von Nervenfasern innerviert, die zunächst Muskelmassen durchlaufen oder vom Periost aus auf die Gelenkkapsel übertreten.

Weitere nozizeptive Elemente sind die perivaskulären, vegetativen Nervenplexi innerhalb der gesamten Gelenkkapselwand (SAMUEL 1949, 1952; HEES 1990; SMOLLICH 1992; NAKAYAMA et al. 1995; LIEBICH 2010).



**Abb. 1: Rami articulares der Nervi ulnaris, medianus, musculocutaneus und radialis sowie ihre Eintrittsstelle(n) in die Gelenkkapsel;
 N. ulnaris teilweise vom Epicondylus medialis verdeckt;
 Linkes Ellbogengelenk eines Hundes, kraniale Ansicht,
 Muskelstümpfe der Mm. biceps brachii und brachialis zur Seite geklappt (gebogene Pfeile)
 Strichliert: Ligg. collateralia, Lig. anulare radii und Lig. obliquum
 (Staszyk und Gasse 1999)**

2.2 Osteoarthritis

2.2.1 Ätiologie und Pathogenese

"Arthrosen repräsentieren eine Gruppe von sich überlappenden Krankheiten, die möglicherweise unterschiedliche Ätiologien, aber ähnliche biologische, morphologische und klinische Abläufe aufweisen." Die Erkrankung betrifft nicht nur den Gelenkknorpel, sondern das gesamte Gelenk, einschließlich subchondralem Knochen, Bändern, Kapsel, Synovialis und periartikuläre Muskeln (KEUTTNER und GOLDBERG 1995). Synonyme für den Begriff OA sind u.a. Osteoarthritis, Arthrose, Arthrosis deformans und degenerative Gelenkerkrankung (JUBB u. KENNEDY 1970; DÄMMRICH 1978; BOLZ u. DIETZ 1985). Die OA ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung.

Knorpel und Subchondralregion bilden in Funktion und Ernährung eine Einheit. Die Aufgabe besteht darin, zusammen mit der Synovialflüssigkeit eine reibungslose Bewegung im Gelenk herzustellen und Belastungen abzufangen. Voll funktionsfähiger Knorpel absorbiert allerdings nur 1-3% einer Last, die Subchondralregion hingegen bis zu 30%. Der Rest wird durch Muskeln und Knochen abgefangen. Die Deformierung der Regionen bei Belastungen ist zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels absolut notwendig (WATT 2000).

An der Entstehung einer OA sind viele biochemische und biomechanische Faktoren beteiligt. Kommt es dabei zu einem Ungleichgewicht zwischen Anabolismus und Katabolismus, ist die Folge eine Knorpelzerstörung mit assoziierten Läsionen des benachbarten Knochengewebes und entzündliche Läsionen synovialer Strukturen (JOHNSTON 1997). Im Anfangsstadium der OA ist meist nur mikroskopisch eine Auffaserung der oberflächlichen Knorpelschichten zu erkennen (GREISEN et al. 1982). Dies geschieht, da sich die parallel zur Knorpeloberfläche angeordneten Kollagenfibrillen separieren. Damit geht die Festigkeit und Integrität der tieferen Schichten verloren, so dass der Knorpel in der Tiefe abnormalem Stress ausgesetzt ist und Fissuren entstehen, die bis in den subchondralen Knochen reichen können (AYDELOTTE und KUETTNER 1993). Die Chondrozyten im degenerativ veränderten Gelenk werden zu Beginn größer und bilden Cluster, welche aus nicht funktionsfähigen Chondrozyten bestehen (FASSBENDER 1983). Die Schwellung des Knorpels beruht auf der geänderten Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Das kollagene Netzwerk wird zerstört und die Proteoglykane können so mehr Wasser binden. Dieser Prozess wird bei der normalen Alterung nicht beobachtet (BULLOUGH 1992). Durch die zunehmende Schädigung der Chondrozyten tritt ein vermehrter Verlust an Proteoglykanen ein, wodurch der Knorpel an Elastizität und Spannkraft verliert. Der Knorpel wird dünner und es kommt zu tiefen Rissbildungen (IMHOF et al. 2002). Belastete Knorpelschichten flachen ab, während die unbelasteten hypertrophieren. Durch die Veränderungen werden zum Teil Knorpelfragmente frei, was im Ergebnis den kompletten Knorpelverlust zur Folge hat (MOSKOWITZ und GOLDBERG 1987). Die freien Knorpelfragmente werden von Synovialmakrophagen phagozytiert, die Zytokine und Prostaglandine freisetzen (BONIFACE et al. 1988). Letzteres hat eine Entzündung zur Folge, die wiederum zur Steigerung des Knorpelabbaus führt (PEDERSEN et al. 1989, HEWICKER-TRAUTWEIN et al. 1999).

Im Frühstadium der Arthrose liegt nur ein oberflächlicher Knorpelschaden vor, welcher röntgenologisch nicht nachweisbar ist (KNEISSL und VIDONI 2008). Zur Frühdiagnostik sollen v.a. andere bildgebende Verfahren wie Arthrographie, Arthroskopie, Ultraschall oder Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt werden, da diese die Darstellung des Knorpelgewebes ermöglichen (KNEISSL und VIDONI 2008). Im späteren Verlauf ist durch verschiedene bildgebende Verfahren (Röntgen, Arthrographie, Computertomographie (CT)) die entstandene subchondrale Sklerose detektierbar (KNEISSL und VIDONI 2008).

Die typischen Zeichen einer Arthrose im Spätstadium sind im Röntgenbild ein verminderter oder inkongruenter Gelenkspalt, Verbreiterung und Verformung der Gelenkfläche, Exostosen, freie Gelenkkörper und Verkalkung der angrenzenden Weichteile (KNEISSL und VIDONI 2008). Im Spätstadium werden Schnittbildverfahren wie MRT und CT vor allem eingesetzt, um freie Gelenkkörper, Band- oder Meniskusverletzungen zu erkennen (KNEISSL und VIDONI 2008).

Im MRT können Knochenmarksödeme als Folge von Osteoarthritis (MARTIN et al. 2007) oder Trauma (KOFLEER et al. 2007) sehr gut detektiert werden.

Nach neuesten Erkenntnissen tritt die lebenslange Abnutzung des Knorpels als alleinige Ätiologie in den Hintergrund. Bedeutung haben auch die vaskuläre Perfusion unter akuter und chronischer Überlastung,

Funktionsstörungen in den tiefsten Schichten des Gelenkknorpels und der Subchondralregion, angeborene (z.B. Fehlstellungen, metabolische Fehlfunktionen, individuell unterschiedliche Vaskularisation und Elastizität des Knorpels) sowie erworbene Faktoren (z.B. Überlastungen, Zustand nach Frakturen) (IMHOF et al. 2002). Bekannte Arthrosiserisikofaktoren sind hohes Körpergewicht, Zustand nach akutem, schwerem Gelenktrauma, chronische Gelenk- oder Sehnenüberlastung, Fehlstellungen bzw. Fehlhaltungen und Dysplasien. Von großer Bedeutung sind auch angeborene oder erworbene Muskel- und Bandlockerungen, da eine unversehrte Funktion von Muskeln und Sehnen sowie die Innervation für die Normalfunktion eines Gelenks sehr wichtig sind (RESNICK 1995).

Aus klinischer Sicht können Arthrosen in primäre und sekundäre Arthrosen eingeteilt werden. Als primäre Arthrosen werden solche bezeichnet, deren Ätiologien derzeit unklar (idiopathisch) sind. Sekundäre beruhen hingegen auf einer bekannten Ursache. Typisch für letztere sind u.a. metabolisch und neurogen bedingte Arthropathien sowie postentzündliche und posttraumatische Arthrosen (MOHR 1997). Klinische Symptome der Arthrose sind Schmerz, Gelenkerguss, Probleme beim Aufstehen, Bewegungseinschränkungen, zunehmende Fehlstellungen durch Entlastungshaltung. Erste Symptome treten meist aufgrund von größeren, subchondralen Knochenmarködemen, Synovialisverdickungen und oder Ergussbildung auf (IMHOF et al. 2002). Oft zeigt sich die „stumme“, d.h. nicht entzündlich involvierte Arthrose als schmerzlos. Ebenso ist noch die klinisch dekompensierte Arthrose abzugrenzen, bei der es in Folge der Gelenkfehlstellung zu Dauerschmerz kommt.

2.2.2 Cubarthrose beim Hund

Die typischen Patienten mit einer chronischen Ellbogengelenksarthrose sind im mittleren bis hohen Alter und zeigten bereits in den ersten Lebensjahren Lahmheiten auf den Vordergliedmaßen oder sind bereits am Ellbogen operiert (BÖTTCHER und GREVEL 2008). Der Gelenkknorpel im Bereich des medialen Kompartiments ist meist hochgradig degeneriert bis vollständig abgerieben (BÖTTCHER und GREVEL 2008). Häufig weist der mediale Kronfortsatz Fissuren oder Frakturen auf und es existieren Osteophyten und freie Gelenkkörper (BÖTTCHER und GREVEL 2008). Die typische Kombination unterschiedlicher Pathologien wird am Ellbogengelenk als „medial compartment disease“ bezeichnet (KRAMER et al. 2006). Die ED ist zu einer der wichtigsten orthopädischen Krankheiten des Hundes geworden. Sehr häufig entwickeln sich durch die Dysplasie Arthrosen und daraus folgende Lahmheiten (GRONDALEN und LINGAAS 1991). Die ED ist ein chronisch verlaufender Krankheitskomplex des Ellbogengelenks, von dem meist schnellwüchsige, große Hunderassen, insbesondere im jungen Alter betroffen sind. Eine Dysplasie entsteht, wenn die gelenkbildenden Knochenteile (Humerus, Radius und Ulna) nicht exakt genug zueinander passen. Diese ungenaue Passform führt zu Umbauvorgängen am Ellbogengelenk und den gelenkbildenden Knochenteilen. Bei geringer Inkongruenz der Gelenkflächen ist die OA das einzige Anzeichen einer ED (READ 1993; SAMOY et al. 2006). Darüber hinaus umfasst der Begriff ED die spezifischen Krankheitsbilder „fragmentierter Processus coronoideus medialis ulnae (FCP)“, „Osteochondrosis dissecans des Condylus medialis humeri (OCD)“, „Isolierung des Processus anconaeus (IPA)“. Im Antebrachium sind

Wachstumsstörungen besonders häufig, da dessen Längenwachstum beim Radius zu 60-70% von der *distalen* und zu 30-40% von der *proximalen Epiphyse* erfolgt. Die Ulna wächst in ihrer Gesamtlänge zu 85% von der *distalen* und zu 15% von der *proximalen Epiphyse* aus. Jede Epiphysenfugenschädigung verursacht eine Fehlstellung des Antebrachiums (KÁSA et al. 2001). Häufig ist bei der radiologischen Untersuchung der betroffenen Hunde nur eine OA und keine der oben genannten Grunderkrankungen zu erkennen (OLSSON 1975). Zur genauen Diagnose der ED ist eine radiologische Untersuchung des Ellbogengelenks wichtig. Die 1989 gegründete „International Elbow Working Group“ (IEWG) empfiehlt als Standardaufnahme die gebeugte mediolaterale Aufnahme mit einem Öffnungswinkel von 45°. Die Bewertung erfolgt nach einem einheitlichen System und beruht auf der Klassifizierung der arthrotischen Veränderungen (IEWG 2010).

Das Krankheitsbild des FCP manifestiert sich an dem mechanisch am stärksten belasteten Teil der Ulna, dem inneren Kronfortsatz. Zu erkennen ist eine flächenhafte Ablösung des Gelenkknorpels, eine teilweise oder vollständige Fissur oder die Ablösung einer Knorpelschuppe, die bis ins Gelenk vordringen kann (BRUNNBERG und WAIBL 1986; WINHART 1991).

Beim IPA unterbleibt die Fusion zwischen der Ulna und dem *Proc. anconaeus*. Die daraus resultierende Ellbogeninstabilität und Gelenkmaus ist schmerzhaft und mit arthrotischen Veränderungen verbunden (VAN SICKLE 1975).

Die OCD kommt fast ausschließlich am *Condylus medialis humeri* vor (READ 1993). Bei der OCD kommt es zur Ablösung von Knorpelfragmenten, welche entweder noch partiell Kontakt zur Knorpelschicht haben (Knorpelflap) oder sich komplett losgelöst als freie Dissekate im Gelenk befinden (OLSSON 1993). Zur Diagnose sollten immer beide Gliedmaßen im Seitenvergleich in zwei Ebenen geröntgt werden.

Die Therapie dieser Grunderkrankungen erfolgt chirurgisch. Dies ist zudem die einzige Möglichkeit, die Ausbildung einer OA zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Trotzdem ist die OA eine sehr häufige Komplikation der ED. Arthrose äußert sich durch Schädigung des Gelenkknorpels, Osteophytenbildung, Knochenveränderungen, pathologische Veränderungen der umgebenden Gewebe, der Synovia, des subchondralen Knochens, der Muskeln, Bänder und Sehnen und durch eine nicht-eitrige Entzündung verschiedener Ausprägungsgrade (FOX 2010). Klinisch äußert sich die OA durch Unbeweglichkeiten im Gelenk und Schmerzäußerungen (FOX 2010).



**Abb. 2: Chronische Cubarthrose eines Hundes durch ED (Latero-laterale Aufnahme)
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**



**Abb. 3: Chronische Cubarthrose eines Hundes durch ED (Aufnahme: anterior-posterior)
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**



**Abb. 4: Ellbogengelenk eines Hundes ohne Befund (Latero-laterale Aufnahme)
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

2.2.3 Schmerzentstehung und Verarbeitung

Die „Internationale Gesellschaft für Schmerzforschung“ hat Schmerz als „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlichen und /oder möglichen Gewebeschäden verbunden ist oder mit Begriffen solcher Schäden beschrieben wird“ definiert (HELLEBREKERS 2001).

Schmerzen sind für den Körper wichtig, da sie eine biologische Schutzfunktion haben, dem Organismus als Schadenfrühwarnsystem dienen und Schutzreflexe auslösen. In diesem Fall spricht man von physiologischem Schmerz, der durch schädliche Hitze, Kälte oder Druck ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu steht der pathologische Schmerz, der längere Zeit anhält und für den Körper als Stressor wirkt und neuroendokrine und metabolische Stress-Reaktionen auslöst (BOCKSTAHLER et al. 2004). Der pathologische Schmerz entsteht bei Erkrankung oder Schädigung eines Organs, während das Nervensystem gesund ist. Im Gegensatz dazu steht der neuropatische Schmerz, bei dem die Nervenfasern selbst in Mitleidenschaft gezogen werden. Neuropatische Schmerzen entstehen häufig episodenhaft, ohne Bezug zu einem Reiz. Sie sind brennend, bohrend und werden als äußerst unangenehm empfunden (VAN DEN BERG 2003). Neben diesen episodischen Schmerzen besteht häufig eine *Hyperalgesie* oder eine *Allodynie* (Schmerzen bei einfachen Berührungsreizen). Typisch dabei ist, dass der Schmerz oft nicht am Ort der Schädigung wahrgenommen wird, sondern in das Versorgungsgebiet des betroffenen Nerven projiziert wird (VAN DEN BERG 2003).

Davon abzugrenzen ist der Begriff „Nozizeption“. Dieser steht in Zusammenhang mit dem Erkennen von Signalen im Nervensystem, wobei der Ursprung in sensiblen Rezeptoren (Nozizeptoren) liegt, die die Informationen in Verbindung mit Gewebeschäden aufnehmen (HELLEBREKERS 2001). Die subjektive Empfindung „Schmerz“ ist zwar häufig eine Folge der Erregung der Nozizeptoren, aber nicht jede Erregung der Nozizeptoren ist zwangsläufig von Schmerzen gefolgt. Umgekehrt gibt es zahlreiche Schmerzarten, an denen die Erregung von Nozizeptoren nicht beteiligt ist, wie zum Beispiel viele Formen neuralgischer und chronischer Schmerzen (BIRBAUMER und SCHMIDT 1999; FÖLSCH et al. 2000; HANDWERKER 1999; SCHMIDT et al. 1999).

Nozizeptoren sind vielfach verzweigte Endigungen von sehr dünnen Nervenfasern, die nur einen durchschnittlichen Durchmesser von 1 µm haben (SCHMIDT 2002).

Die Nozizeptoren der Haut lassen sich in zwei große Gruppen einteilen:

1. myelinisierte, mit A- delta Leitungsgeschwindigkeit (2,5-50 m/s) leitende, hochschwellige Mechanorezeptoren, die den schnellen, scharfen Schmerz auslösen
2. unmyelinisierte C- Fasern (unter 2,5 m/s), die als polymodale Nozizeptoren sowohl auf mechanische, thermische als auch chemische Noxen reagieren und für den länger andauernden Schmerz verantwortlich sind (ENGELHARDT und BREVES 2000)

Zusätzlich gibt es noch sogenannte „schlafende“ Nozizeptoren, die nicht durch physiologisch auftretende mechanische Reize (z.B. starke Dehnung eines Gelenks) erregbar sind. Diese werden in Folge eines pathologischen Zustandes aktiv (ENGELHARDT und BREVES 2000).

Von der Schmerzauslösung bis zur Schmerzwahrnehmung im Gehirn laufen folgende Vorgänge ab:

Der gewebeschädigende oder potentiell gewebeschädigende Reiz (noxischer Reiz) wird von freien Nervenendigungen (Nozizeptoren) wahrgenommen (Transduktion). Sie leiten über die A- delta oder die C-Fasern das Aktionspotential zum Dorsalhorn des Rückenmarks (Transmission). Dort erfolgt die synaptische Übertragung und Modulation. Motorische Flucht- und Schutzreflexe werden ausgelöst (nozifensive Reflexe). Vom Dorsalhorn des Rückenmarks wird der Reiz, nach Kreuzung auf die kontralaterale Seite zum Thalamus und Kortex weitergeleitet und hier als Schmerz wahrgenommen (Perzeption). Der Begriff Nozizeption schließt die Transduktion, Transmission, Modulation und Perzeption ein (BOCKSTAHLER et al. 2004). Nozizeptoren findet man auch in Muskeln, Gelenken, inneren Organen und in fast allen anderen Organen des Körpers mit Ausnahme des Zentralnervensystems (ZNS) (ENGELHARDT und BREVES 2000). Die Perikarya der Nozizeptoren liegen in den Spinalganglien (ENGELHARDT und BREVES 2000). Eine wesentliche Eigenschaft der Nozizeptoren ist ihre „Chemosensibilität“. Sie sind erregbar durch Mediatoren, die im Laufe eines Entzündungsprozesses im Gewebe freigesetzt werden. Diese Mediatoren können Rezeptoren in der Membran der Nozizeptoren aktivieren (VAN DEN BERG 2003).

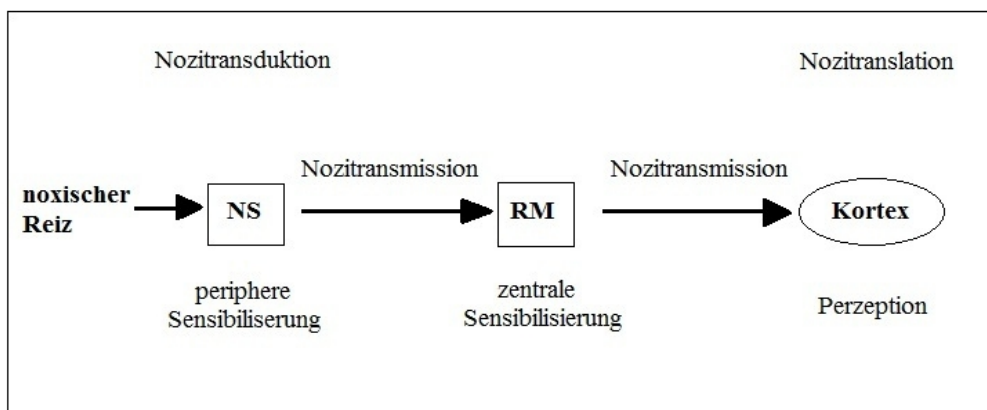


Abb. 5: Nozizeptionsvorgänge vom Nozisor (NS) über das Rückenmark (RM) bis zum Kortex (nach TACKE 2003)

Bekannt sind Rezeptoren für die Mediatoren Bradykinin, Prostaglandin E2 (PGE2), Serotonin, Histamin, Acetylcholin und ATP. Auch für Neuropeptide (z.B. Substanz P (SP), Somatostatin) werden in einem Teil der Nozizeptoren Rezeptoren exprimiert. Daneben besitzen Nozizeptoren auch Rezeptorkomplexe für Zytokine und Neurotrophine. Zytokine werden besonders bei chronischen Entzündungen freigesetzt. Neurotrophine haben vor allem die Aufgabe, die Synthese von Neuropeptiden zu stimulieren (VAN DEN BERG 2003). Die freigesetzten Neuropeptide wirken auf Rezeptoren, die auf verschiedensten Zellen lokalisiert sind. An den Gefäßen kommt es zur Vasodilatation und einer Plasmaextravasation. Neuropeptide können zur Degranulation von Mastzellen führen, welche wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen. Die Schwelle für noxische Reize ist weder für alle Nozizeptoren einheitlich, noch ist sie für einen gegebenen Nozizeptor konstant, d.h. Nozizeptoren können sensibilisiert und desensibilisiert werden (SCHMIDT 2002). Im gesunden Gewebe ist die Schwelle für manche Nozizeptoren so hoch, dass sie nicht zu erregen sind. Diese nennt man „schlafende“ Nozizeptoren. Ist dieses Gewebe aber zum Beispiel durch eine Entzündung pathologisch verändert, werden die Rezeptoren zum Teil so sensibilisiert, dass selbst normalerweise nicht - noxische Reize zur Erregung führen (SCHMIDT 2002). Diese Veränderung geschieht durch Entzündungsmediatoren, die in großen Mengen freigesetzt werden und die freien Nervenendigungen

umgeben. Dadurch wird die Empfindlichkeit der vormals hochschwelligen Nozizeptoren stark gesteigert. Dieses Phänomen wird periphere Sensibilisierung genannt (HELLEBREKERS 2001).

Nozizeptive Neurone im Rückenmark, die die Reize aus der Peripherie aufnehmen und zum Großhirn weiterleiten, zeigen bei Entzündungen und anderen pathologischen Zuständen erheblich gesteigerte Aktivität. Dieses Phänomen wird zentrale Sensibilisierung genannt und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen (SCHAIBLE und GRUPP 1993). Als chronisch wird ein Schmerz bezeichnet, der mehr als 6 Monate ununterbrochen fortbesteht. Schmerz kann sich dann von seiner ursprünglichen Ursache, der Gewebszerstörung lösen und sich verselbstständigen, d.h. trotz völliger Ausschaltung der nozizeptiven Reizung aus der entsprechenden Körperregion fortbestehen (BIRBAUMER und SCHMIDT 1999).

Eine weitere wichtige Erkenntnis ist, dass unmittelbare Konsequenzen von Schmerz mitbestimmen, ob der Schmerz bestehen bleibt, abklingt oder wiederkommt. In Anlehnung an die Lernpsychologie spricht man von der operanten Schmerzkomponente oder dem „Schmerzgedächtnis“. Dieses Lernen bedeutet, dass positive und negative Konsequenzen die Auftrittswahrscheinlichkeit des Schmerzes erhöhen oder erniedrigen können. Die häufigsten Konsequenzen sind soziale Zuwendung und Schmerzmedikamente (BIRBAUMER und SCHMIDT 1999). Neben den schmerzverstärkenden Mechanismen gibt es auch inhibitorische Schmerzkontrollsysteme. Schmerzhemmend wirken: endogene Opioide (Enkephaline, Endorphine), Adenosin, Noradrenalin, Dopamin und Gamma-Amino-Buttersäure (BOCKSTAHLER et al. 2004).

Der Schmerz kann anhand unterschiedlicher Gesichtspunkte verschieden eingeteilt werden:

Einteilung nach	Beispiel	Bemerkung
Dauer	akut	- Warnfunktion - Kann im Allgemeinen gut durch Analgetika beeinflusst werden
	chronisch	- Keine direkte Beziehung zur Noxe, eigenes Krankheitsbild ohne Warnfunktion - Pharmakologisch schwer zu beeinflussen - Häufiges Einsatzgebiet für Physiotherapie und physikalische Therapie
Entstehungsort	somatisch	- Oberflächenschmerz (Haut) - Tiefenschmerz (Bänder, Knochen, Muskulatur, Faszien, Periost, Gelenke etc.)
	viszeral	- Innere Organe der Brust-, Bauch- und Beckenhöhle
Klinischen Gesichtspunkten	postoperativ/traumatisch	- Akuter Schmerz
	chronisch degenerativ	- Inaktivierung, Muskelatrophie und dadurch weitere Verschlechterung möglich
	neurogen/neuropathisch	- durch Verletzung des peripheren oder zentralen Nervensystems - Phantomschmerz - I.d.R. chronischer Schmerz
	Malignomschmerz	- Abhängig von Lokalisation, Größe und Metastasierungsrate des Tumors

Abb. 6: Einteilung des Schmerzes (BOCKSTAHLER et al. 2004)

Für die Schmerztherapie ist es wichtig, die Schmerzen zu „messen“ (BOCKSTAHLER et al. 2004). Da beim Tier die Schmerzen allein vom Untersucher eingeschätzt werden müssen, ist es hier auch sinnvoll, den

Besitzer in die Beurteilung mit einzubeziehen, da er am besten Abweichungen von individuellen Verhaltensweisen seines Tieres bewerten kann. In die Schmerzmessung können Herzfrequenz, Atemfrequenz und Blutdruck mit einbezogen werden, wobei diese Parameter auch immer durch Stress oder Aufregung verändert werden können. Weitere Anhaltspunkte sind „Lautäußerungen des Patienten“, dessen Verhalten, Körperhaltung, Schmerzen bei der Palpation, Lahmheit und Verspannung der Muskulatur, die Mimik, Salivation, die Pupille, Futteraufnahme und Mutilation. Diese Parameter werden in einem Schmerzfragebogen zusammengefasst und vor und während der Schmerztherapie ausgefüllt (BOCKSTAHLER et al. 2004). Chronische Schmerzen fallen häufig erst spät auf, da die Entwicklung langsam einsetzt. Deutliches Anzeichen bei chronisch degenerativen Gelenkerkrankungen ist teilweise nur die Muskelatrophie. Das Ausmaß der Schmerzen wird manchmal erst nach durchgeführter Schmerztherapie sichtbar (BOCKSTAHLER et al. 2004).

2.2.3.1 Schmerz bei Osteoarthritis

OA gilt als die häufigste Ursache für chronische Schmerzen beim Hund (FOX 2010). OA wird oft fälschlicherweise als eine Erkrankung des Knorpels bezeichnet. Bei der OA können alle Strukturen des Gelenks von einer Schädigung betroffen sein (MYERS et al. 1990). Die Schmerzen können also von allen Bereichen des Gelenks ausgehen, außer vom Knorpel selbst, da dieser nerven- und gefäßlos ist (FOX 2010). Diese pathologischen Veränderungen äußern sich durch Bewegungseinschränkung und Schmerzzeichen. OA- Schmerzen sind das Resultat einer komplexen Interaktion zwischen strukturellen und biochemischen Veränderungen, zentralen und peripheren Schmerzmechanismen und individuellem Schmerzempfinden (FOX 2010). Typischer OA- Schmerz ist schleichend, variabel und intermittierend, was meist von den Patientenbesitzern als „gute und schlechte Tage“ beschrieben wird (CREAMER 2004). Der Grund für diese intermittierenden Schmerzen ist unklar. Ein Einfluss des Wetters wird diskutiert. STRUSBERG et al. (2002) haben herausgefunden, dass OA- Schmerzen mit niedriger Temperatur und hoher Luftfeuchtigkeit korrelieren. Jede Theorie bezüglich der Schmerzen der OA muss berücksichtigen, dass die Hauptstruktur, die beteiligt ist (Knorpel) keine Schmerzrezeptoren aufweist (CREAMER 2004). Neuere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass es im Laufe einer Arthroseentstehung zu einer Einsprossung von Blutgefäßen und Nerven von der subchondralen Knochenplatte in den degenerierten Knorpel kommt (SURI et al. 2007).

Die Gelenkafferenzen, die an der Schmerzweiterleitung beteiligt sind, bestehen aus dicken, myelinisierten A-Beta und A-Delta Fasern und einem hohen Anteil an unmyelinisierten C-Fasern. A-Beta Fasern findet man in der Kapsel, den Bändern, Menisken und dem angrenzenden Periost. A-Delta und C-Fasern enden als freie Nervenendigungen in der Kapsel, Fettgewebe, Bänder, Menisken und dem Periost (JOHANNSSON et al. 1991). Bei der Aktivierung von Neuronen können aus den Endigungen Neuropeptide als Transmitter freigesetzt werden. Im Gelenk findet man am häufigsten SP und Somatostatin. Synovialozyten produzieren unter dem Einfluss von SP vermehrt Prostaglandin E2 (PGE2), welches stark in das Entzündungsgeschehen

involviert ist (VAN DEN BERG 2003). Prostaglandin erhöht die Gefäßpermeabilität und verstärkt den Schmerz, indem es nozizeptive Nervenendigungen sensibilisiert (SIMMONS et al. 2004). WYKE (1981) hat 4 Typen von Rezeptoren im Gelenk beschrieben. Die in der Kapsel vorkommenden Typ I und Typ II Rezeptoren (Mechanorezeptoren) antworten auf mechanische Stimuli wie Druck oder Dehnung. Sie befinden sich in oberflächlichen und tiefen Schichten der Kapsel und leiten die Informationen schnell über myelinisierte Fasern weiter. Typ II Rezeptoren sind schneller adaptierend als Typ I (STURGE et al. 1978). Zusammen mit anderen Rezeptoren in Muskeln und Haut vermitteln sie die Stellung und Bewegung des Gelenks. Typ III Rezeptoren sind nicht im Gelenk, aber an Bändern vorhanden. Sie sind während normaler Gelenkbewegung inaktiv. Stimuliert werden sie durch starke mechanische Belastung (STURGE et al. 1978). Typ IV Rezeptoren sind sehr hochschwellige, langsam adaptierende, polymodale freie Nervenendigungen. Sie reagieren auf thermische und chemische Reize, können aber auch durch Druck und Dehnung stimuliert werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Schmerzen, welche durch erhöhten intraartikulären Druck, beispielsweise bei einem Gelenkerguss, ausgelöst werden. Diese Rezeptoren sind überall im Gelenk, außer im aneuralen Knorpel, zu finden. Sie leiten die Informationen über dünne myelinisierte A-Delta oder C-Fasern (STURGE et al. 1978). Einige dieser Rezeptoren gehören vermutlich auch zu den sogenannten „schlafenden“ Nozizeptoren (SCHMIDT 1996). Sie werden erst bei Entzündung durch Sensibilisierung aktiv.

In früheren Studien wurde OA als nicht-entzündlich eingestuft. Jetzt unterscheidet man zwischen einer inaktiven, nicht entzündlichen Form und einer aktivierten OA, die mit einer Entzündung einhergeht. Die inaktive Form kann jederzeit in eine aktivierte OA übergehen (FOX 2010). Die Schmerzen bei OA sind demnach durch verschiedene Mechanismen initiiert. Bei der aktivierten OA wird der Schmerz durch die Entzündung hervorgerufen. Eine Entzündung innerhalb des Gelenks ist meist charakterisiert durch Hyperalgesie und langanhaltende Schmerzen (LEWIS 1938; KELLGREN 1939; KELLGREN & SAMUEL 1950). Dann werden mechanische Stimulationen, die normal als nicht unangenehm wahrgenommen werden, als schmerzhaft empfunden. Dieses erhöhte Schmerzempfinden wird ausgelöst durch periphere und zentrale Sensibilisierung (SCHAIBLE 2004). Bei der inaktiven OA unterscheiden wir zwischen dem Anlaufschmerz, dem Bewegungsschmerz und dem Ruheschmerz. Schmerzen können ebenfalls durch verspannte Muskulatur hervorgerufen werden (CREAMER 2004). OA muss jedoch nicht immer mit Schmerzen einhergehen, sondern kann ebenso symptomlos verlaufen.

Die Gelenkkapsel ist sehr gut innerviert und meist bei einer Arthrose deutlich verdickt, was zu einer lokalen Vermehrung der Schmerzrezeptoren führt. Diese stellen dann bei Zug auf die Kapsel eine bedeutende Schmerzquelle dar (BÖTTCHER und GREVEL 2008). Die innere Auskleidung der Gelenkkapsel ist nur ein bis zwei Zelllagen stark und beinhaltet Typ A und B Synoviozyten. Typ A sind Makrophagen-ähnliche Zellen, welche bei der Entfernung von Abfallprodukten und der Produktion von Antigenen eine Rolle spielen. Typ B sind fibroblasten-ähnliche Zellen, welche für die Produktion von Hyaluronsäure (HS) verantwortlich sind, aber auch degenerative Enzyme produzieren können. Beide Typen produzieren Zytokine und andere Mediatoren (MULLER-LADNER et al. 1997). Wird durch eine Überlastung oder ein sonstiges Trauma das Gelenk verletzt, werden diese Zellen stimuliert, entsprechende Stoffe freizusetzen. Durch die

daraus folgende Entzündung wird aus einer ruhenden OA eine aktivierte OA. Sobald die Zytokine und die Entzündungsmediatoren in der Synovia vorhanden sind, stimulieren sie vor allem die Synoviozyten vom Typ B, weitere Abbauenzyme zu produzieren, welche durch Diffusion in den Knorpel gelangen und der Kreislauf beginnt von vorne (PELLETIER et al. 1985).

Die Synovia vieler OA Patienten zeigt eine hohe Anzahl mononukleärer Zellen und eine hohe Anzahl an Immunoglobulinen. Die Synovialmembran zeigt Anzeichen einer chronischen Entzündung, die durch eine Hyperplasie der Wand und eine Infiltration von Entzündungszellen gekennzeichnet ist (KONTTINEN et al. 1994). Durch eine vorhandene Entzündung entsteht der sogenannte Ruheschmerz. Schmerzen können ebenso vom subchondralen Knochen ausgehen. Diese subchondrale Schicht stellt eine dünnere Verbindung zwischen dem hyalinen Knorpel und der Spongiosa dar und enthält freie Nervenendigungen, die die Schmerz-Information weiterleiten. Die besondere Anordnung der Fasern erlaubt es, Druck auf das Gelenk zu kompensieren. Die Subchondralregion ist bis zu zehnfach mehr verformbar als anderer Knochen. Eine Knorpelanschwellung und Verformung dieser Region wird oft bei OA beobachtet. Dadurch wird die Beweglichkeit des Gelenks eingeschränkt. Subchondraler Knochen beinhaltet unmyelinisierte Nervenfasern, deren Anzahl sich bei OA erhöht (REIMANN und CHRISTENSEN 1977). Verstärkter Druck auf den subchondralen Knochen, verbunden mit OA führt zu einer Stimulierung dieser Nervenfasern und damit zu Schmerzen.

Osteophyten (Knochenneubildungen) entstehen durch enchondrale Ossifikation. Ihre Bildung wird durch mechanische Instabilitäten begünstigt. Diese können ebenso eine Quelle für die Entstehung von OA-Schmerzen sein, da sie mit sensiblen Nerven durchsetzt sind (SURI et al. 2007). Obwohl sie zentral im Gelenk auftreten können, findet man sie häufig an der Grenze zur Synovialis, zum Perichondrium und dem Periost (MOSKOWITZ und GOLDBERG 1987). Das Periost enthält viele Nerven, welche durch die Osteophyten stimuliert werden können (FOX und COOK 2001). Bänder und Muskeln rund um das arthrotische Gelenk sind ebenfalls an den Schmerzen beteiligt. Obwohl die Rezeptoren der Bänder hauptsächlich für die Begrenzung der normalen Beweglichkeit des Gelenks verantwortlich sind, sind sie an der Aufrechterhaltung der Schmerzen beteiligt. Atrophie der Muskeln ist ebenso assoziiert mit Schmerz und Unbeweglichkeit (FOX und COOK 2001). Durch die Reizung der Neurorezeptoren innerhalb eines geschädigten Gelenks können Reflexbögen aktiviert werden, welche in einer konstanten Stimulation des Muskelgewebes resultieren. Die daraus entstehende Verspannung der Muskulatur ist ein weiterer wichtiger Faktor in der Schmerzentstehung. Ein leichtes Muskeltrauma führt dann zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die wiederum die Rezeptoren weiter sensibilisieren (FOX und COOK 2001).

Knorpel hat im Gelenk durch seine elastischen Eigenschaften die Funktion, Druck und Stöße abzufangen, aber auch, das Periost der beiden beteiligten Knochen voneinander zu trennen. OA ist durch eine Degeneration des Knorpels gekennzeichnet. Durch den Verlust des Knorpels kommt es zu einer vermehrten Reibung zwischen den beiden Knochenteilen. Da das Periost stark innerviert ist, kommt es zu Schmerzen bei der Bewegung (FOX 2010). Die Synovia enthält Elektrolyte und kleinere Moleküle wie beispielsweise Glucose und Laktat, vergleichbar mit der Zusammensetzung des Blutplasmas. Die Diffusion größerer Moleküle wird durch die Synovialis verhindert. Die Viskosität der Synovia ist abhängig von Länge, Struktur

und Interaktion der Hyaluronsäure- Polysacharid- Ketten. Je länger und polymerisierter die HS, desto höher die Viskosität (BENNET und MAY 1995). Im Ruhezustand bilden die Hyaluronaggregate ein Netzwerk, das bei Bewegung depolymerisiert. Die Synovia wird dünnflüssiger und Diffusionsvorgänge werden somit erleichtert (FERNANDEZ et al. 1983). Durch den dazu geschädigten Knorpel kommt es am Anfang der Bewegung zu einer Reibung der Knochenoberflächen, die solange anhält, bis durch die Synovia die Gleitfähigkeit wieder hergestellt ist. So entsteht der sogenannte Anlaufschmerz. Kommt es nun aufgrund von Schmerzen zu einer Schonung des Gelenkes, wird zum einen der Knorpel nicht mehr richtig mit Nährstoffen versorgt, zum anderen bleibt die Synovia sehr zähflüssig, was wiederum eine vermehrte Reibung und damit mehr Schmerzen zur Folge hat. Bei einer Entzündung kommt es außerdem durch die Entzündungsmediatoren zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Blutgefäße in der Synovialmembran (SIMKIN 1997). Dadurch wird die Zusammensetzung der Synovia und das Volumen geändert.

2.3 Therapiemöglichkeiten der Osteoarthritis

Die Ziele einer OA - Behandlung bestehen darin, den Schweregrad der Symptome zu mindern, eine akzeptable Lebensqualität aufrecht zu erhalten, Schmerzen zu kontrollieren, das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen und die Wiederherstellung von geschädigtem Gewebe, wo immer möglich zu fördern (MILLIS 2002). Eine Heilung der Erkrankung ist nicht möglich (SANDERSON et al. 2009). Die Behandlung einer Arthritis umfasst eine Reihe an konservativen Maßnahmen, wie beispielsweise die Kontrolle des Körpergewichts, eine kontrollierte Bewegung, Physiotherapie und eine Behandlung auf der Grundlage von Arzneimitteln und /oder Nutrazeuticals. Dem gegenüber stehen die chirurgischen Möglichkeiten, zu denen die Denervation und der künstliche Gelenkersatz zählt.

2.3.1 Konservative Möglichkeiten

2.3.1.1 Gewichtsreduktion

Adipositas steht in engem Zusammenhang zur Entwicklung von Arthritis beim Menschen und trägt in ähnlicher Weise zum Fortschreiten von Arthritis bei Hunden bei (FELSON et al. 1992). So besteht zum Beispiel für schwergewichtige Menschen eine 3,5 mal höhere Wahrscheinlichkeit, an Arthritis zu erkranken als für schlanke Personen und ein Gewichtsverlust von 5 kg lässt diesen Faktor um 50% zurückgehen (SCHRAGER 1995). Bei Hunden geht man von der gleichen Wirkung aus.

2.3.1.2 Nicht- steroidale Entzündungshemmer

Obwohl Arthritis zytologisch als nicht entzündlicher Prozess eingestuft wird, sind Entzündungsmediatoren und Entzündungszellen stark an der fortschreitenden Schädigung des Gelenkknorpelgewebes beteiligt (MILLIS 2002). An der Entstehung einer aktivierten OA mit einer Entzündung im Gelenk ist vor allem die

Cyclooxygenase (COX) beteiligt. Hierbei handelt es sich um ein Enzym, welches die Umsetzung der Arachidonsäure zu wichtigen Botenstoffen katalysiert. Arachidonsäure wird aus den Membranphospholipiden durch die Phospholipase (PLA2) freigesetzt und kann über die COX und Lipoxygenase weiter verstoffwechselt werden. Durch die Katalyse der Lipoxygenase entstehen Leukotriene, durch die COX werden Prostaglandine und Thromboxane synthetisiert. Neben Prostaglandinen werden aus Arachidonsäure auch andere Fettsäureprodukte gebildet, die unter dem Begriff Eicosanoide zusammengefasst werden. Eicosanoide und Leukotriene gehören zu den körpereigenen Entzündungsmediatoren und halten eine Entzündung aufrecht (KIETZMANN und BÄUMER 2010).

Es sind zwei Isoformen der COX bekannt, die COX-1, welche in fast allen Geweben exprimiert wird (CROFFORD 1997) und vor allem an physiologischen Funktionen, wie z.B. der Protektion der Magenschleimhaut und Kontrolle des renalen Blutflusses, beteiligt ist, und die COX-2, welche meist unter pathologischen Bedingungen im Körper gefunden wird. COX-2 wird nach unterschiedlichen Stimuli, wie z.B. proinflammatorische Zytokine (MITCHELL et al. 1994), Endotoxine und Tumorpromotoren (LEE and IP 1992) sowie als Antwort auf Stress durch Verletzung, bakterieller Infektion usw. freigesetzt.

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der Gelenkschmerzen stark gewandelt. So ist es mittlerweile offensichtlich, dass die Schmerzen nicht bloß als Folgeerscheinung der Arthrose auftreten, sondern auch für die Progression dieser Erkrankung von Bedeutung sind (FIORENTINO et al 2008). Da die Schmerzen bei OA hauptsächlich durch die Entzündung hervorgerufen werden, zielt eine Schmerzbehandlung vor allem auf die Hemmung der Entzündung ab. Dafür werden vor allem NSAIDs eingesetzt. Diese hemmen die COX-Enzyme und können so die Synthese der Entzündungsmediatoren reduzieren und die mit OA verbundenen Schmerzen lindern. Viele unerwünschte Effekte dieser Medikamente wie beispielsweise Magen- Darm-Ulcerationen oder verminderte Nierenperfusion wurden mit der Hemmung der COX-1- abhängigen protektiven Prostaglandine assoziiert, wohingegen die erwünschten therapeutischen, antientzündlichen und schmerzlindernden Effekte mit einer Hemmung der COX-2 abhängigen proinflammatorischen Prostaglandine in Verbindung gebracht wurden. Ältere NSAIDs hemmen meist unselektiv die COX, was zu erhöhtem Auftreten von Nebenwirkungen führt, während neuere NSAIDs selektiv die COX 2 hemmen sollen. Die am meisten verwendeten Entzündungshemmer in der Tiermedizin sind Carprofen, Meloxicam und Piroxicam, wobei Carprofen und Meloxicam selektive COX 2 Hemmer sind. Neue Erkenntnisse zeigen, dass auch ein hoher Gehalt an Omega-3 Fettsäuren im Futter die Bildung von Entzündungsmediatoren verringern kann.

Eine Studie zur kontinuierlichen Langzeittherapie mit NSAIDs (täglich über 28 Tage) bei Hunden mit OA erbrachte Hinweise darauf, dass die kontinuierliche NSAID Gabe gegenüber der Kurzzeittherapie einen klinischen Nutzen aufweist und nicht mit einem vermehrten Auftreten von Nebenwirkungen einhergeht (ANON. 2009). Um die tägliche Verabreichung eines Arzneimittels zu verhindern wurde im Jahr 2010 ein neues NSAID, Trocoxil, entwickelt, welches ab der zweiten Dosis nur einmal monatlich verabreicht werden muss. Der Wirkstoff Mavacoxib ist ein neuartiger COX 2 Inhibitor, der aufgrund seiner pharmakokinetischen Eigenschaften besonders gut für die kontinuierliche Behandlung geeignet ist (COX et al. 2010). Eine Studie mit diesem Arzneimittel ergab, dass die dauerhafte monatliche Anwendung zu einer stetigen Besserung führt (PAYNE-JOHNSON 2009).

Bei der konservativen Therapie mit entzündungshemmenden Mitteln sind es aber häufig die Nebenwirkungen der Medikamente, die eine dauerhafte Therapie zweifelhaft erscheinen lassen. Vor allem der Einsatz bei noch recht jungen Tieren, die aufgrund einer ED unter OA leiden, sollte genau überdacht werden. Durch die Entwicklung der rein selektiven COX-2 Hemmer konnten die Nebenwirkungen zwar deutlich reduziert werden, eine Langzeittherapie erscheint trotzdem nicht sinnvoll.

Die häufigsten Nebenwirkungen betreffen den Gastrointestinaltrakt, die Leber und die Niere.

2.3.1.3 Physiotherapie und Reizstrom

Ziel einer Physiotherapie ist die Erhöhung der Gelenkbeweglichkeit und die Stärkung der Stütz Muskulatur. Werden Muskeln nicht eingesetzt, führt dies zur Atrophie und Schwäche. Da eine sehr wichtige Aufgabe der Muskulatur das Abfangen von Stößen ist, ist es wichtig, diese zu trainieren. Zur Erhaltung des Gelenkknorpels ist eine ständige Synthese von Fibrillen und Grundsubstanz notwendig. Der Reiz zur Synthese wird zum einen durch Be- und Entlastung hervorgerufen, zum anderen spielt die mechanische Verformung der Knorpelzellen eine wichtige Rolle. Be- und Entlastung des Knorpels ermöglichen den Transport von Nährstoffen und Wasser aus der Synovia in den Gelenkknorpel. Ein Mangel an physiologischer Bewegung führen zu einem Mangel an Nährstoffen und damit zu einem Matrixverlust. Die Folge ist eine geringere Wasserbindung und damit verbunden ein Elastizitätsverlust (BOCKSTAHLER et al. 2004). Leichte Belastungsübungen tragen so auch zur Stimulierung des Knorpelgewebestoffwechsels bei und erhöhen die Diffusion von Nährstoffen. Gleichzeitig wird durch die Bewegung das Gewicht des Patienten reduziert. Ein Übungsprogramm muss immer auf den jeweiligen Patienten abgestimmt sein und eine Überlastung der Gelenke sollte auf ein Minimum reduziert werden. Am besten geeignet sind Übungen wie Gehen und Schwimmen. Gelenkinstabilitäten sollten vorher chirurgisch behoben werden (MILLIS 2002).

Zu den in der Veterinärmedizin gebräuchlichen Methoden gehört zum Beispiel die Anwendung lokaler Kälte, die zu einer Senkung des Zellmetabolismus, der Zellpermeabilität, Vasokonstriktion und Herabsetzung der Nervenleitgeschwindigkeit sensorischer und motorischer Fasern führt. Die sogenannte Kryotherapie wird demnach zur Verminderung der lokalen Durchblutung als Mittel zur Schmerz- und Entzündungshemmung eingesetzt (BOCKSTAHLER 2008). Durch eine kurze Applikation von Kälte kann eine Anregung der Muskelspindeln erreicht werden, was zu einer Erhöhung des Muskeltonus führt (JAGGY 2007). Im Gegensatz dazu führt die oberflächliche Applikation von Wärme zu einer Hyperämie, Verminderung von Muskelspannungen, zu einer erhöhten Dehnbarkeit bindegewebiger Strukturen und zur Schmerzreduktion. Die Nervenleitgeschwindigkeit sensorischer und motorischer Fasern wird gesteigert, deren Latenzzeit herabgesetzt und biochemische Prozesse werden beschleunigt (HEINRICHS 2004). Um tiefer gelegenes Gewebe zu erwärmen, kann der therapeutische Ultraschall (Frequenzbereich zwischen 0,5 und 5 MHz) eingesetzt werden.

Unter dem Begriff Bewegungstherapie werden verschiedene Therapieformen (passive, passiv- assistierte, aktive Bewegungstherapie) zusammengefasst. Passive Therapie dient der Atrophie- und Kontrakturprophylaxe und der Flexibilität von Muskulatur, Sehnen und Bändern (JAGGY 2007). Dazu

gehören die „Passive Range of Motion“- Übungen, bei der die Gelenke sanft gebeugt und gestreckt werden, das Streching (Dehnungsübungen), das Auslösen des Flexor- Reflexes und das Radfahren im Liegen und im Stehen. Assistierte Bewegungsübungen bilden den Übergang von der rein passiven Übung zu der aktiven Übung. Das Ziel ist die Förderung der Kraft und der Ausdauer, der Propriozeption und des neuromuskulären Bewusstseins. Zu den Übungen zählen beispielsweise Gewichtsverlagerung, Wackelbretter und Gymnastikbälle. Der Hund wird dabei immer vom Therapeuten gestützt (BOCKSTAHLER et al. 2004). In der aktiven Bewegungstherapie sollen neben der Kräftigung der Muskulatur und Verbesserung der Kondition bei Bedarf auch die koordinativen und propriozeptiven Fähigkeiten der Patienten geschult werden (BOCKSTAHLER 2008). Zu den aktiven Übungen zählen langsames Gehen, Laufbandtraining, Treppen steigen, Jogging oder Cavaletti- Stangen.

Eine weitere Möglichkeit stellen Reizstrom bzw. Elektrotherapie dar, bei der elektrische Ströme zu Heilzwecken auf meist umschriebene Areale des Körpers appliziert werden (JAGGY 2007). Eine der bekanntesten dieser Therapieformen stellt die transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) dar (siehe Abb. 7), welche vor allem in der Schmerzbekämpfung Anwendung findet (BOCKSTAHLER et al. 2004). Die analgetische Wirkung der Elektrotherapie wird erklärt durch die von MELZACK und WALL (1965) beschriebene Gate- Control- Therapie. Diese Theorie verfolgt den Grundgedanken, dass eine aktuelle Schmerzübertragung zum Gehirn durch sich schließende Tore auf der Höhe des Rückenmarks und im Thalamus, der Schaltzentrale zwischen Rückenmark und Gehirn, blockiert wird. Das Schmerztor kann geschlossen werden, indem Mechanorezeptoren stimuliert werden (MELZACK und WALL 1965). Die TENS Behandlung zielt auf die Stimulation der dicken Nervenfasern ab, um die Schmerztore im behandelten Bereich zu schließen. Zusätzlich nimmt man die Wirkung von Endorphinen und Enkephalinen an, die vom Körper als Antwort auf den Schmerzreiz freigesetzt werden (ANON. zitiert vom 08.10.2010).



Abb. 7: Positionierung der E- Pads am Ellbogengelenk bei der TENS- Behandlung (BOCKSTAHLER et al. 2004)

Im Gegensatz zum Menschen, bei dem zahlreiche Studien die positive Wirkung von Physiotherapie zur unterstützenden Behandlung von Arthrose belegen, sind fundierte Studien in der Veterinärmedizin noch selten. Trotzdem bestätigen zahlreiche praktische Erfahrungen die positiven Effekte der Physiotherapie beim Hund. Allerdings stellt die Physiotherapie nur eine begleitende Maßnahme dar.

Die Reizstromtherapie bietet sicherlich ebenfalls eine gute Möglichkeit zur unterstützenden Behandlung der OA, erreicht aber alleine keine gute Schmerzlinderung.

2.3.1.4 Nutrazeuticals

Als nutritive Maßnahmen bei OA stehen sogenannte „Chondroprotektiva“ kommerziell zur Verfügung, die als „Knorpelschutzsubstanzen“ begleitend zur Behandlung oder zur Prävention degenerativer Gelenkerkrankungen beim Hund, aber auch beim Menschen empfohlen werden (VERVUERT 2008). Ein wesentlicher Wirkmechanismus der Chondroprotektiva ist die Substratbereitstellung für die Kollagen- und Hyaluronsynthese. Ein weiterer Wirkmechanismus stellt die Modifikation der entzündlichen Prozesse dar, wobei die Hemmung knorpelzerstörender Enzyme oder die Suppression von Entzündungsmediatoren eine Rolle spielen. Von Interesse ist ebenfalls der antioxidative Wirkmechanismus der Substanzen (VERVUERT 2008). Die vielfältigen degenerativen und entzündlichen Prozesse bei Arthritiden verdeutlichen, dass verschiedene Wirkmechanismen wünschenswert sind, dass aber in der Regel eine Substanz nicht alle Kriterien erfüllen kann (VERVUERT 2008).

a) Glukosaminoglykane

Glukosaminoglykane sind wichtige Bestandteile des Gelenkknorpels, da sie zur Bildung von Proteoglykanen beitragen, welche dem Knorpel seine elastische Qualität und seine Widerstandsfähigkeit verleihen (ELAIN-SERGENT 2008). Bei OA kommt es zu einem Verlust dieser Stoffe und der Bedarf an Vorläufersubstanzen ist sehr hoch (ELAIN-SERGENT 2008; NEIL et al. 2005).

Glukosamin ist eine Vorläufersubstanz für die Synthese von Aminosäuren und eines der wichtigsten Proteoglykane. Es wird aus intrazellulärer Glucose gebildet. Sein Hauptsyntheseort ist das Knorpelgewebe (MROZ und SILBERT 2003; KELLY 1998). Kommerziell erhältliches Glukosamin stammt aus Chitin, welches im Exoskelett von Krebstieren vorkommt. Ebenso eingesetzt wird Chondroitinsulfat, welches durch Aufbereitung bovinem oder porcinem Gelenkknorpels gewonnen wird. Mangan unterstützt die Synthese der Knorpelmatrix und der Synovialflüssigkeit und soll antioxidative Eigenschaften besitzen (BEALE 2004). Die Absorption von Glukosamin erreicht beim Hund 87% (MCNAMARA et al. 1996). Es passiert die Darmzellen auf dem Weg der Diffusion (KELLY 1998). Nennenswerte Konzentrationen finden sich in der Leber, der Niere und auch dem Gelenkknorpel. Der Einbau in das Knorpelgewebe findet nach oraler Gabe sehr schnell statt. Die Bioverfügbarkeit beträgt 44% (SETNIKAR und ROVATI 2001). Die Absorption von Chondroitinsulfat ist nicht ganz geklärt. Die Bioverfügbarkeit wird wahrscheinlich erhöht durch multiple orale Gaben eines Chondroitinsulfats mit einem niedrigen Molekulargewicht (SETNIKAR und ROVATI 2001). Glukosaminoglykane werden relativ häufig bei der Therapie der OA eingesetzt, da es, oral verabreicht, auch sehr einfach zu handhaben ist. Bei der Beurteilung der Glykosaminoglykane in der Therapie muss allerdings ein In- Vitro und ein In- Vivo Effekt unterschieden werden. In- Vitro können Glukosamin und Chondroitinsulfat die Zerstörung arthrotischen Knorpels verhindern (SEVALLA et al. 2000). In- Vivo werden allerdings vermutlich die größten Anteile der oral verabreichten

Glukosaminoglykane in der Leber metabolisiert und über die Niere und vermutlich auch über die Lunge ausgeschieden (SETNIKAR und ROVATI 2001).

Klinische Untersuchungen beim Hund weisen darauf hin, dass kein Effekt der oralen Supplementierung dieser Substanzen zu erwarten ist (FROST-CHRISTENSEN et al. 2006).

b) Grünlippenmuschel

Das erhältliche Grünlippenmuschel-Pulver enthält Glykosaminoglykane, Omega-3 Fettsäuren, Aminosäuren, Vitamine und Mineralstoffe und scheint durch ihre antiinflammatorischen Eigenschaften auf ähnliche Weise wie die neuesten NSAIDs zu wirken (HIELM-BJORKMAN et al. 2009; BUI und BIERER 2003). Entgegen älterer Studien scheint der Gehalt an Glukosaminoglykanen allerdings eher vernachlässigbar zu sein, dafür rückt aber der erhebliche Anteil an Omega-3 Fettsäuren in den Vordergrund, der wahrscheinlich für den stark antiinflammatorischen Mechanismus verantwortlich ist (MURPHY et al. 2003). In einigen Studien mit Chondroprotektiva wurde von einer leichten bis deutlichen Besserung der Lahmheitssymptome nach Verfütterung von Grünlippenmuschel berichtet. Problem bei diesen Studien ist, dass es keine Kontroll- oder Placebogruppe gab (KORTHÄUSER und TORRE 1992). Die maximale Wirksamkeit der Grünlippenmuschel wird nachweislich bei gering- bis mittelgradig betroffenen Patienten beobachtet (HIELM-BJORKMAN et al. 2009). In einer Arbeit von DOBENECKER et al. (2002) ergab die Bewertung durch die Tierhalter keinen Unterschied zu Placebogruppe.

C) Omega- 3 und Omega- 6 Fettsäuren

Den Omega- 3 Fettsäuren wird ein entzündungs- und immunmodulierender Effekt zugeschrieben, wobei verschiedene Mechanismen wie z.B. die Beeinflussung der Phagozytoseleistung durch Veränderung der Membranfluidität, Veränderung von Signalfunktionen oder die Beeinflussung der Eicosanoidsynthese durch Suppression hochpotenter inflammatorischer Mediatoren (z.B. Suppression von PGE 2 oder von Leukotrienen der 4-er Serie) eine mögliche Rolle, auch im Rahmen der OA, spielen (VERVUERT 2008). Für die Bildung von Entzündungsmediatoren ist die Arachidonsäure der wichtigste Vertreter der Omega-6 Fettsäuren. Durch die COX entstehen aus der Arachidonsäure Prostaglandine, welche maßgeblich am Entzündungsgeschehen beteiligt sind.

Ziel ist es, den Anteil der Omega-6 Fettsäuren in den Zellmembranen durch Omega-3 Fettsäuren zu ersetzen, um dadurch die Bildung vasoaktiver und proinflammatorischer Eicosanoide zu reduzieren. Es ist bekannt, dass Prostaglandine aus den Omega-3 Fettsäuren zu einer geringeren Vasodilatation und weniger Ödemen führen und nicht so entzündungsfördernd sind wie die Prostaglandine aus den Omega-6 Fettsäuren (LEE et al. 1985, BAGGA et al. 2003,). Zu den unerwünschten Nebenwirkungen zählen eine erhöhte Blutungsneigung durch herabgesetzte Thrombozytenaktivität, eine Absenkung des Vitamin E Spiegels im Serum und eine generelle Steigerung der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress, welche jedoch bei Verwendung der empfohlenen Dosierungen nicht beobachtet werden (BRIGHT et al. 1994, SAKER et al. 1998).

Zu den wichtigen Omega-3 Fettsäuren gehören die Eicosapentaensäure (EPA) und die Docosahexaensäure (DHA). Beide besitzen starke antiinflammatorische Eigenschaften. Ein erhöhter Anteil Omega-3 Fettsäuren im Futter kann durch seine entzündungshemmenden Eigenschaften einen guten Beitrag zur Arthrosetherapie leisten und vor allem den Einsatz von NSAIDs reduzieren. In zwei Studien wurde bei einer mehrmonatigen Fütterung einer Omega 3- reichen Diät eine geringere PGE-2 Konzentration in der Synovia, geringere radiologische Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe und eine verbesserte Gangbewertung festgestellt (Zitiert nach BUDSBERG und BARTGES 2006). Beide Studien sind allerdings bislang nicht publiziert (VERVUERT 2008).

2.3.1.5 Hyaluronsäure

Die HS kommt in hoher Konzentration in der Synovia vor (UNGEMACH 2003) und ist dort das größte Makromolekül (TULAMO et al. 1996). Sie dient im Gelenk zur Pufferung, Schmierung der Gelenksflächen, sowie der Reduktion des Influxes von Proteinen und Zellen ins Gelenk (AUER et al. 1980).

Es wurde beobachtet, dass in der Synovialflüssigkeit von Menschen mit OA (EVANICH et al. 2001; CASTOR et al. 1966; BALAZS et al. 1967) und bei Rennpferden mit traumatischer Arthritis die Konzentration hochmolekularer HS vermindert ist (HILBERT et al. 1984). Intraartikulär injizierte HS reduziert die Freisetzung von lysosomalen Enzymen, Zytokinen und Proteoglykanen in der Synovia (TAKAHASHI et al. 2001; COMER et al. 1996; HIROTA 1998; AKATSUKA et al. 1993; YASUI et al. 1992). Der durch die intraartikuläre Entzündung entstehende und für den Gelenkknorpel folgenschwere degenerative Prozess wird somit vermindert. Durch die Substitution von HS wird zusätzlich versucht, die Gleitfähigkeit der Gelenkflächen zu verbessern und damit die Regeneration der geschädigten Knorpeloberfläche zu unterstützen (AUER et al. 1980; YARBROUGH 2003). Eine intravenöse Applikation wird ebenfalls beschrieben, jedoch als wenig sinnvoll deklariert (UNGEMACH 2003).

Der klinische Erfolg einer intraartikulären Behandlung mit HS ist schwer abzuschätzen. Es wird beschrieben, dass die Therapie bei Hunden zu einem reduziertem Gelenkerguss und einer klinischer Verbesserung der Lahmheit führt (HELLSTROM et al. 2003; GANNON 1998; GAUSTAD und LARSEN 1995; YARBROUGH 2003). Jedoch geht man aufgrund der Gefahr einer septischen Arthritis nach der intraartikulären Injektion von einem negativen Nutzen- Risiko- Verhältnis aus (UNGEMACH 2003).

2.3.1.6 Strahlentherapie

Bereits kurz nach der Entdeckung der Röntgenstrahlen 1895 durch Wilhelm Conrad Röntgen wurde realisiert, dass es für deren Anwendung nicht nur diagnostische, sondern auch therapeutische Indikationen gibt. 1938 beschreibt POMMER beschreibt die Behandlung akuter und chronischer Arthritiden und Periarthritiden mittels Strahlentherapie (POMMER et al. 1958). Er beobachtete sowohl Schmerzreduktion, als auch verminderte Gelenkschwellung (BUCHHOLZ 2008). Durch Einengung des Primärstrahls und durch die bei der Entzündungsbestrahlung des Hundes relativ niedrigen verwendeten Dosis konnte das Auftreten

somatischer Strahlenschäden vermieden werden (HARTUNG 1973). HARTUNG (1980), der in einer Studie 34 Hunde bestrahlte, berichtete, dass es bei 80% der Patienten zu einer lang andauernden klinischen Besserung kam. BOROFFKA (1995) beschreibt in einer Studie mit 124 Hunden, die wegen einer chronisch degenerativen Gelenkerkrankung bestrahlt wurden, dass 41% der Tiere beschwerdefrei waren und 32% eine deutliche Besserung zeigten.

In der heutigen Zeit wird die Strahlentherapie meist mit der Behandlung maligner Tumore assoziiert. Wichtig bei der Betrachtung der Strahlentherapie ist, dass sowohl das Ziel als auch der Ablauf der Therapie bei benignen und malignen Prozessen grundlegend voneinander zu trennen sind (BUCHHOLZ 2008). Bei den Protokollen im Bereich der Tumorbehandlung werden häufig täglich hohe Dosen verwendet mit dem Ziel, das gesamte Tumorgewebe zu zerstören (GILETTE 1987). Bei der Bestrahlung chronisch degenerativer Gelenkerkrankungen werden niedrige Dosen verabreicht mit dem Ziel, funktionelle Störungen zu beseitigen (BUCHHOLZ 2008). Die Wirkung der ionisierenden Strahlen beruht einerseits auf der Zerstörung von Entzündungszellen, wodurch es zu einer Aktivierung der Phagozytentätigkeit kommt. Die Modulation der Expression von Zytokinen auf Endothelzellen und Leukozyten scheint an der antiinflammatorischen Wirkung maßgeblich beteiligt zu sein (MACCOUX et al. 2007). Andererseits führt die neurovegetative Beeinflussung des neuralen Endapparates der Synovialis zu einer analgetischen Wirkung (BUCHHOLZ 2008).

Die Strahlentherapie ist jedoch immer mit einer Narkose für das Tier und einer Strahlenbelastung für die Halteperson verbunden. Zudem ist sie nicht überall verfügbar. Die Entwicklung effektiver Medikamente mit geringer Toxizität führte daher zu deutlich verminderter Anwendung der Strahlentherapie bei nicht neoplastischen Gelenkerkrankungen (BUCHHOLZ 2008). Es ist wichtig, dass der Einsatz ionisierender Strahlung bei einer solchen Indikation streng hinterfragt wird, wobei die zum Teil erheblichen Nebenwirkungen der eingesetzten Pharmazeutika ebenfalls nicht unterschätzt werden sollten (BUCHHOLZ 2008).

2.3.2 Operative Möglichkeiten

2.3.2.1 Endoprothese

Die folgenden Angaben stammen, falls nicht anders angegeben, von DÉJARDIN (2009).

Der erste Versuch einer Endoprothese im Ellbogengelenk des Hundes wurde 1996 von LEWIS beschrieben. Durch die starre Verbindung zwischen dem Humerus und Radius und Ulna traten sehr viele Komplikationen, wie zum Beispiel Frakturen oder Luxationen, auf. Weitere Entwicklungen folgten, die trotzdem noch schwere Komplikationen verursachten. Die nächste Generation folgte 2005 durch CONZEMIUS, der ein „ungebundenes System“ entwickelte, in der es keine starren Verbindungen gab. Voraussetzung dafür ist, dass die angrenzenden Gewebe, wie beispielsweise Bänder, einige Belastungen auffangen und somit das Implantat weniger belastet wird.

Die neueste Entwicklung stammt von ACKERMANN und VAN DER MEULEN (2007). Es handelt sich auch um ein „ungebundenes System“, welches allerdings nicht „einzementiert“, sondern mittels „press-fit“ verankert wird. Die humerale Komponente besteht aus einer Cobalt-Chrome-Legierung und die Radius-Ulna-Komponente aus Polyethylen. Beim Einsatz dieser Prothese muss das Ellbogengelenk nicht mehr luxiert werden, was die Bänder schont. Durch die poröse Struktur kann das Knochengewebe gut mit dem Implantat verwachsen und bietet so eine gute Stabilität.

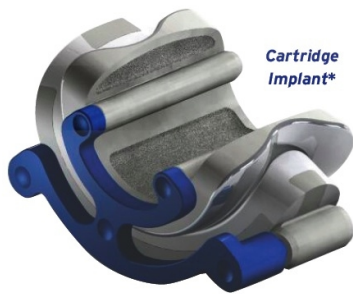


Abb. 8: TATE Elbow System, Ellbogengelenksprothese (DEJARDIN 2009)



Abb. 9: Röntgenaufnahme eines Ellbogengelenks mit Prothese (TATE Elbow System) (DEJARDIN 2009)

Mit diesem System treten noch immer Komplikationen auf, die allerdings nicht mehr so gravierend sind wie bei früheren Prothesentypen. Längere Studien fehlen noch. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ellbogengelenksprothesen beim Hund noch nicht so ausgereift sind, dass sie zu einem zufriedenstellenden Ergebnis führen. Zudem liegen die Kosten bei ca. 3000 Euro.

2.3.2.2 Denervation

2.3.2.2.1 Chirurgisch

Die chirurgische Denervation als Therapie der OA ist beim Hund vor allem im Bereich des Hüftgelenks etabliert und wird mit Erfolg durchgeführt (KINZEL et al. 2002). Ziel der Denervation ist eine sofortige Schmerzbefreiung, die zu einer vermehrten Bewegungsaktivität führt (KINZEL et al. 2008). Bei der chirurgischen Denervation im Bereich des Hüftgelenks werden die beteiligten sensorischen Nerven durch Deperiostierung zerstört. Dabei wird das Periost mit einem scharfen Löffel bis auf die Kortikalis zerstört (KINZEL et al. 2008). Die Denervation des Ellbogengelenks würde ebenfalls eine Verbesserung der Gliedmaßenfunktion erzielen. Diese Erwartung stützt sich auf Ergebnisse nach einer diagnostischen Anästhesie am Ellbogengelenk des Hundes (BUDER 2005). Ein entsprechender chirurgischer Eingriff am Ellbogengelenk ist nicht beschrieben und anatomische Studien und Versuche haben gezeigt, dass dies kaum möglich ist. Grund dafür ist die besonders komplexe Anatomie des Ellbogengelenks (BÖTTCHER und GREVEL 2008).

2.3.2.2.2 Saporin

Definition und Vorkommen

Saporin ist ein äußerst potentes toxisches Protein, welches von der Pflanze „*Saponaria officinalis*“ produziert wird und aus dieser gewonnen werden kann. Es wurde von STIRPE et al. im Rahmen ihrer Untersuchung von Pflanzentoxinen um ca. 1970 entdeckt (ANON. 2010). Es existieren verschiedene Isoformen von Saporin, die in den Samen, den Blättern und den Wurzeln dieser Pflanze gefunden wurden (FERRERAS et al. 1993).

Saporin gehört zu der Gruppe der pflanzlichen Ribosomen- inaktivierenden- Proteine (RIPs), hat eine absolute Molekülmasse von etwa 27000 bis 30000 Da und besteht nur aus einer einzigen Polypeptidkette, gehört daher zu den Typ 1 RIPs (STIRPE 2004).

Ribosomen- inaktivierende- Proteine (RIPs)

RIPs sind eine Gruppe von Proteinen, die die Ribosomenaktivität und damit die Proteinbiosynthese enzymatisch hemmen. Sie kommen in verschiedenen Pflanzen und Bakterien vor und werden unterteilt in Typ1 und Typ 2 RIPs (STIRPE 2004). Typ 1 RIPs, wie beispielsweise Saporin, besitzen nur eine einzige Polypeptidkette mit einer Größe von ca. 30 kDa (STIRPE 2004). Typ 2 RIPs (z.B. Ricin, Volkensin), bestehen aus einer enzymatisch aktiven A- Kette, ähnlich der Typ 1- RIP Polypeptidkette, die über Disulfidbrücken mit einer etwas größeren B-Kette (35 kDa) verbunden ist (OLSNES und PIHL 1973). Die B-Kette, ein Lectinartiges Protein mit Affinität zu Zelloberflächenkohlenhydraten, dient der Bindung an die Zelloberfläche und vermittelt so das Eindringen des Toxins in die Zelle, wo die A- Kette ihre enzymatische Aktivität, die Inaktivierung der Ribosomen, entfalten kann (STIRPE 2004). Durch das Fehlen dieser B- Kette bei den Typ 1 RIPs, können diese nicht aktiv und ohne Carrier in die Zelle eindringen und sind somit nicht toxisch für intakte Zellen, behalten jedoch ihre extreme Wirksamkeit gegen zellfreie Proteintranslationssysteme (STIRPE et al. 1980). Ebenso können sie ihre toxische Wirkung entfalten, wenn sie durch die Verbindung mit einem entsprechenden Vektor in die Zelle eingeschleust werden (STIRPE et al. 1980).

Wirkungsweise

Nach Bindung an die Zelle werden die RIPs durch Endozytose aufgenommen und folgen dann einem intrazellulären Weg. Einige gelangen zum Golgi- Apparat und von dort zum Zytoplasma, andere werden über die Lysosomen aktiv aus der Zelle ausgeschlossen (SANDVIG und VAN DEURS 2002). Unterschiede in diesen Prozessen führen so auch zu unterschiedlich hoher Toxizität.

Wird Saporin durch einen Carrier in die Zelle eingeschleust, spaltet es als N- Glykosidasen einen essentiellen Adeninrest (Adenin 4324) an der 28 S- Untereinheit der ribosomalen RNA (rRNA) ab und hemmt damit

irreversibel die weitere Proteinbiosynthese, wodurch die Zelle zugrunde geht (NIELSEN und BOSTON 2001). Inaktivierung von ca. 10% der Ribosomen in einer Zelle ist ausreichend, um die Zelle zu zerstören (WILEY und KLINE 2000). Es ist wahrscheinlich, dass nur ein einziges Molekül des Toxins, welches sich frei im Zytosol befindet, ausreicht, um genügend Ribosomen zu inaktivieren und die Zelle zu zerstören (WILEY und KLINE 2000).

Bei Versuchen mit Ricin, Abrin und Modeccin, die den gleichen Wirkmechanismus haben wie Saporin, konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen einen „alles- oder- nichts- Effekt“ haben, Zellen also entweder zerstört oder unversehrt sind. Es gibt keine partiell zerstörten Zellen (WILEY et al. 2003).

OX7-Saporin

Um seine Wirkung an den Ribosomen entfalten zu können, muss Saporin aktiv über Endozytose in die Zelle gelangen. Da Saporin zu den Typ 1 RIPs gehört, verfügt es aber über keine intrinsische Bindungsaktivität, muss also erst an einen entsprechenden Carrier gebunden werden (STIRPE 2004). Bereits Paul Ehrlich entdeckte, dass diverse Antikörper genutzt werden können, um toxische Stoffe zu bestimmten Zellen zu transportieren und diese zu zerstören. Diese Kombination aus meist monoklonalen Antikörpern zusammen mit einem Toxin wird als Immunotoxin bezeichnet (STIRPE 2004). Für die Verbindung von RIPs mit Antikörpern können nur Typ1 RIPs oder nur die A-Kette der Typ 2 RIPs genutzt werden, da die B- Kette unselektiv an diverse Zellen binden würde (STIRPE 2004). Das erste in vivo effektive Anti- Neuronale Immunotoxin war OX7-Saporin (WILEY et al. 1989). Dieses besteht aus Saporin, gekoppelt an den monoklonalen Antikörper OX7, welcher an die Zelle bindet und dadurch das Toxin mit in die Zelle einschleust. Innerhalb der Zelle löst sich die Bindung von Saporin an den Antikörper und das Toxin kann seine Wirkung entfalten (ANON. 2010).

Der Antikörper OX7 ist spezifisch für das Thy 1 Oberflächenantigen bei Ratten. Thy 1 wird bei Ratten fast ausschließlich von allen ausgereiften Neuronen und einigen T-Lymphozyten exprimiert (RAFF et al. 1979; CRAWFORD und BARTON 1986). Beim Hund exprimieren im Gegensatz zur Ratte neben neuronalen Strukturen auch Stütz- und Bindegewebe das Thy 1 Oberflächenglykoprotein. Hier sind vor allem Fibroblasten Träger dieses Antigens (DALCHAU und FABRE 1979a, 1979b; MCKENZIE und FABRE 1981). Zellen, die kein spezifisches Oberflächenantigen haben, werden nicht angegriffen (ANON. 2010). Auch das, nach dem Zerfall der Zelle wieder freigewordene Saporin ist zu diesem Zeitpunkt ohne biologische Aktivität, da es seinen Antikörper eingebüßt hat.

OX7-Saporin ist ein effektives „suicide transport agent“ bei Ratten im peripheren und zentralen Nervensystem (WILEY et al. 1989). Es ist einfach im Handling, da nicht wie bei Typ 2 RIPs zuerst die B-Kette abgespalten werden muss und es verursacht geringe systemische Toxizität (WILEY und KLINE 2000).

Salo et.al. nutzte OX7-Saporin für seine OA- Versuche an Ratten (SALO et al. 1997). In seinen ersten Studien wurde Fluoro-Gold (FG) in das Kniegelenk der Ratte injiziert, um einen Überblick über die markierten, afferenten Nervenbahnen zu erhalten. Da auch FG retrograd transportiert wird, wurden die

Spinalganglien der Ratten präpariert und auf vorhandene, markierte Neurone untersucht (SALO et al. 1996). In seinen nächsten Experimenten wurde zunächst wieder FG und eine Woche später OX7-Saporin intraartikulär injiziert. Die Tiere zeigten im Laufe der Experimente keinerlei Nebenwirkungen. Bei der Auswertung der Präparate wurde deutlich, dass durch die Injektion von OX7-Saporin ca. 88% der afferenten Nervenfasern zerstört werden konnten (SALO et al. 1997). In einem weiteren Versuch wurde wiederum das Kniegelenk der Ratte mit OX7-Saporin denerviert und mit FG markiert. Es gab drei Gruppen: bilaterale und unilaterale Denervation und eine Kontrollgruppe. Die Ganglien wurden wie im ersten Versuch untersucht. Gleichzeitig wurden auch die Kniegelenke präpariert und untersucht, um genauere Angaben zur Ausbildung einer OA zu bekommen. In dieser Studie fanden sie vermehrt schwere degenerative Knorpelschäden in den denervierten Knien im Vergleich mit der Kontrollgruppe (SALO et al. 2002). Da allerdings die Zahl der markierten Neurone nicht mit den osteoarthritischen Veränderungen korreliert, ist es unwahrscheinlich, dass die Denervation als alleinige Ursache für die fortschreitenden osteoarthrotischen Veränderungen in Frage kommt. Eine weitere, vermutliche Ursache für das Fortschreiten der OA liegt wahrscheinlich in dem Verlust von einigen protektiven Reflexen (SALO et al. 2002). Einige Forscher beschrieben, dass eine Gelenk-Denervation die Ausbildung einer OA in bereits geschädigten Gelenken beschleunigen kann (KORVICK et al. 1994; SUTER et al. 1998). In gesunden Gelenken konnte kein Effekt der Denervation auf den Knorpel nachgewiesen werden (O'CONNOR und BRANDT 1993). O'CONNOR et al. (1985; 1989) fanden in ihren Versuchen mit Hunden keine OA nach Denervation. Vermutlich kann dies durch drei Unterschiede in den Studien erklärt werden: Die Länge des Versuchs, ein standardisierteres Versuchsprotokoll und die tierartlichen Unterschiede zwischen Ratte und Hund (SALO et al. 2002).

Fluoro- Gold

Um spezifische Markierungen innerhalb verschiedener Zellen oder Zellgruppen darzustellen, bietet sich die Nutzung neuronaler Tracer zur Markierung an (MITCHELL et al. 2001). Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Stoffe, welche als Tracer Verwendung finden. Einige von ihnen werden nur anterograd, d.h. vom Zellkörper weg, oder retrograd zum Soma hin transportiert, andere hingegen können in beide Richtungen arbeiten (MITCHELL et al. 2001).

Bei dem Fluoreszenzfarbstoff FG handelt es sich um einen neuronalen, retrograden Tracer. Er ist auch unter dem Namen „2-hydroxy-4,4'-diamidino stilbene“ oder „Hydroxystilbamidine“ bekannt. (WESSENDORF 1991). Bei diesem Farbstoff handelt es sich um eine schwache Base, er ist hydrophil und kann so beispielsweise in destilliertem Wasser gelöst werden. (WESSENDORF 1991; MITCHELL et al. 2001). FG besitzt gewisse toxische Eigenschaften, was nach der Injektion zu klinischen Symptomen führen kann, welche nach 1 bis 2 Tagen jedoch wieder rückläufig sind (SCHMUED und FALLON 1986; GARRETT et al. 1991). Es wird vermutet, dass eine hohe Konzentration FG innerhalb der Lysosomen diese durch erhöhten osmotischen Druck zum platzen bringen und damit zum Tod der Zelle führen kann (WESSENDORF 1991). FG - Markierungen sind durch eine intensive, fluoreszierende, goldene Farbe gekennzeichnet, die vor allem im Zytoplasma, aber auch an Plasmamembranen zu erkennen sind. Die Zellkerne zeigen keine Aufnahme

des Farbstoffes (SCHMUED und FALLON 1986). FG besitzt kann mit 365 nm gut angeregt werden und hat einen Emissionswert zwischen 410 nm und 565 nm.

Die Aufnahme des FG wird wahrscheinlich durch aktive Endozytose in pinozytische Vesikel vollzogen (SCHMUED und FALLON 1986). Der Tracer wird nicht von anderen intakten Fasern aufgenommen, was die präzise Markierung ganz bestimmter Strukturen erlaubt. Wurde der Tracer retrograd zum Zellkörper transportiert und dort gespeichert, tritt er aus diesem nicht mehr aus. Auch wenn die Überlebenszeit der Tiere nach der Behandlung verlängert wird, verbleibt der Farbstoff innerhalb der Zellen (SCHMUED und FALLON 1986). Aufgrund dessen diffundiert der Farbstoff auch nicht in benachbarte Zellen, was falsch positive Ergebnisse ausschließt (OGILVY und BORGES 1988; RICHMOND et al. 1994). Diese Bindungspermanenz erlaubt auch die Kombination mit vielen anderen histochemischen Techniken, wie beispielsweise der Autoradiographie, der Enzymhistochemie, der Immunocytochemie, von Plastik oder Paraffin Einbettungen sowie die Verwendung weiterer retrograd transportierter Fluoreszenzfarbstoffe (SCHMUED und FALLON 1986). Es wurde jedoch auch beschrieben, dass nach 12 Wochen eine deutliche Reduktion der Zahl FG- markierter Zellen zu erkennen ist (NOVIKOVA et al. 1997). Diese Reduktion kann auf den Abbau von FG oder auf seine potentielle Toxizität zurück zu führen sein (NOVIKOVA et al. 1997; CHOI et al. 2002). Daher scheint es besser, die Versuche mit FG auf vier bis sechs Wochen zu begrenzen (HAYASHI et al. 2004).

Als fluoreszierender Farbstoff muss FG streng gekühlt (bei 4° C) und im Dunkeln gelagert werden. Bei richtiger Verwendung und Lagerung erweist sich die Markierung als sehr resistent gegen Ausbleichen (GARRETT et al. 1991; BARANOWSKI et al. 1992).

Ein wichtiger Punkt bei der Verwendung von FG ist die Berücksichtigung von Autofluoreszenz in den Neuronen, die durch Lipofuszin hervorgerufen wird. Dieses sogenannte Alterspigment reichert sich bei Tieren mit zunehmendem Alter im Zytoplasma verschiedener Zellen, unter anderem auch in Nervenzellen des ZNS an und kann durch seine breiten Excitations- und Emissionsspektren leicht mit FG- Markierungen verwechselt werden (GARRETT et al. 1991; SIMS und GILMORE 1994; TSAI et al. 2001). Die Fluoreszenz, die von Lipofuszin ausgeht ist, ebenso wie FG, punktuell und goldgelb (SCHNELL et al. 1999). Eine Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen FG und Lipofuszin ist durch eine Färbung der Präparate mit Sudan-Schwarz möglich, welches, in Abhängigkeit von der Konzentration, die Fähigkeit besitzt, die Lipofuszin Fluoreszenz zu eliminieren. Ein- bis zehnprozentiges Sudan-Schwarz Lösung eliminiert die von Lipofuszin ausgehende Fluoreszenz komplett, reduziert jedoch in geringem Maße auch die Intensität der FG-Markierungen (SCHNELL et al. 1999).

2.3.2.2.3 Capsaicin

Definition und Wirkungsweise

Capsaicin ist ein Wirkstoff, der hauptsächlich in Chilipflanzen vorkommt und diesen die typische Schärfe verleiht (TEWKSBUURY et al. 2008). Er gehört zu den Vanilloiden und ist ein Agonist der sogenannten

Vanilloid bzw. TRPV1 Rezeptoren. Dieser Rezeptor gehört zu der Familie der TRP- (transient receptor potential) Kanäle (MONTELL et al. 2002). Diese Rezeptoren sind nicht-spannungsabhängige Kationen Kanäle (MONTELL et al. 2002). Hitze, Kälte, Druck, Vanilloide, Osmolaritätsänderungen oder auch Protonen führen über eine Aktivierung des Rezeptors zu einem Kationen- Einstrom, was wiederum zu einer Depolarisation und zum Aktionspotential eines Neurons führt (CLAPHAM et al. 2001, GUNTHORPE et al. 2002, MONTELL et al. 2002). Dabei ist die Permeabilität für Calcium am größten (MONTELL et al. 2002). Bei der Maus exprimieren fast ausschließlich sensible Neurone diesen Rezeptor (CATERINA et al. 1997). Capsaicin aktiviert über TRPV1 sensorische Nervenfasern (MARSH et al. 1987), welche dann einen intensiv brennenden Schmerz vermitteln. Danach gibt es eine Phase der Desensibilisierung gegenüber noxischen Reizen (FITZGERALD und WOOLF 1982). Capsaicin induziert zusätzlich die Freisetzung von Neuropeptiden wie beispielsweise Substanz P und CGRP (HOLZER 1991). Sehr hohe systemische Dosen wirken bei Säugetieren toxisch (JANCOSO et al. 1977; NAGY et al. 1983; LAM und FERRELL 1991).

Klinische Relevanz

Capsaicin ist ein stark hyperämisierender, aber nicht blasenbildender Wirkstoff, der bereits in diversen Medikamenten Verwendung findet. Diese „Hyperämika“ führen bei Anwendung auf der Haut oder Schleimhaut durch axonale Reize zu einer Dilatation von Hautgefäßen mit der Folge einer Hyperämisierung des behandelten Areals. Über afferente Hautnerven kommt es durch einen kutano-visceralen Reflexbogen auch in tieferliegenden Geweben zu einer Vasodilatation und dadurch zu einer verbesserten Durchblutung (UNGEMACH 2003). Durch diese lokale Irritation kommt es zu einer begrenzten Entzündung, welche die körpereigenen Heilungskräfte aktivieren soll. Auch chronische Entzündungen werden dadurch wieder aktiviert und so den Heilungsfähigkeiten des Körpers zugänglich gemacht. Weiterhin werden entzündliche Exsudate schneller resorbiert, Phagozytose beschleunigt und Zerfallsprodukte schneller abtransportiert (UNGEMACH 2003). In Deutschland findet Capsaicin als Wirkstoff vor allem in Rheumasalben bzw. – pflastern Anwendung (UNGEMACH 2003).

Bei einer OA Behandlung steht eine deutliche Schmerzreduktion als Therapieziel im Vordergrund. Durch eine Denervation kann der Anteil der sensiblen Nervenfasern reduziert und damit die Schmerzübertragung geblockt werden. Die chirurgische Denervation des Ellbogengelenks beim Hund ist aufgrund anatomischer Gegebenheiten kaum möglich. Allerdings scheint es möglich, durch intraartikuläre Injektion bestimmter Substanzen eine Betäubung/Denervation der Gelenkhöhle zu erzielen. Für Capsaicin konnte in der Humanmedizin gezeigt werden, dass es nach intraartikulärer Applikation zu einer lang anhaltenden Reduktion der Schmerzen kommt und sich die Belastbarkeit und Funktionalität deutlich verbesserte (CANTILLON et al. 2005; MAHOWALD et al. 2006). Die Wirkung des Capsaicins scheint jedoch reversibel zu sein.

COLPAERT et al. (1983) beschrieben bei Ratten mit OA eine Reduktion der Schwellung eines Gelenkes durch Capsaicin. In einer späteren Studie wurde der Verlauf der Arthrose durch radiologische Veränderungen dokumentiert, welche durch Capsaicin ebenfalls deutlich verbessert wurden (LEVINE et al.

1987). In einer weiteren Studie an Ratten beschrieben CRUWYS et al. (1995), dass eine subcutane Injektion von Capsaicin eine deutliche Reduktion der Schwellung des Gelenkes und der Gliedmaßen zur Folge hatte und die radiologischen und histologischen Zeichen einer Gelenkschädigung vermindert waren.

2.3.2.2.4 Botox

Definition und Wirkungsweise

Botulinumtoxin A (BTA) ist eine neurotoxische Protease (NAEGELI und ALTHAUS 2010) und wird von der Bakterienspezies *Clostridium botulinum* produziert (SEIL et al. 2010). Es ist eines der potentesten Neurotoxine. Es existieren 7 Serotypen (A bis G) und besteht aus einer leichten (50 kDa) und einer schweren (100 kDa) Kette, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (SINGH 2010).

Das Toxin wird über periphere Nervenendigungen aufgenommen, reichert sich in der motorischen Endplatte an und spaltet dort ein synaptosomales Protein, das die exozytotische Freisetzung von Acetylcholin blockiert (NAEGELI und ALTHAUS 2010). Durch die Bindung von Acetylcholin an die zuständigen Rezeptoren wird die Permeabilität von Na⁺- und K⁺-Ionen im Sarcolemm erhöht, wodurch auf der postsynaptischen Membran ein Endplattenpotential entsteht. Durch dieses Potential werden spannungsgesteuerte Na⁺- Kanäle depolarisiert und die entstandenen Aktionspotentiale werden an der Muskelfasermembran fortgeleitet (SZENTKUTI 2000). Durch die Hemmung der Acetylcholinfreisetzung führt BTA zu einer schlaffen Lähmung der quergestreiften Muskulatur (SCHANTZ und JOHNSON 1992). Dies geschieht an allen cholinergen Synapsen des peripheren Nervensystems, aber die Weiterleitung der Information entlang der Axone wird nicht beeinträchtigt (GUYTON und MACDONALD 1947). BT ist für alle Wirbeltiere toxisch und führt über eine Lähmung der Atemmuskulatur zum Tod (SCHANTZ und JOHNSON 1992). Die LD⁵⁰ beträgt für Säugetiere wenige Nanogramm, es ist somit das potenteste bekannte Gift (NAEGELI und ALTHAUS 2010).

In einigen Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass BTA einen schmerzreduzierenden Effekt hat (SCHANTZ und JOHNSON 1992). Der Wirkmechanismus, über den BTA eine analgetische Wirkung im Gelenk entfaltet, ist weitgehend unbekannt (BÖTTCHER und GREVEL 2008). Studien im Labor zeigten für BTA jedoch einen modulierenden Effekt auf die Neurotransmitterfreisetzung, was seinen antinozizeptiven Effekt erklären kann (SINGH et al. 2010).

Klinische Relevanz

BTA wurde in der Medizin beim Menschen zur Therapie des Strabismus eingesetzt. Erste klinische Arbeiten wurden von SCOTT et al. in den 80er Jahren beschrieben (SCHANTZ und JOHNSON, 1992). Eine Therapie der Erkrankung ist chirurgisch möglich, bei der ein Teil des hyperaktiven Muskels entfernt wird, so dass das Auge wieder in seiner normalen Position bleibt (SCHANTZ und JOHNSON 1992). Eine Korrektur mit Hilfe des Toxins erfolgt unter ständiger Kontrolle durch Elektromyographie. BTA wird hierbei vorsichtig in den

hyperaktiven Muskel injiziert und das Auge gleichzeitig in seine richtige Position gebracht (SCHANTZ und JOHNSON 1992).

Für BTA konnte auch gezeigt werden, dass es einen Einfluss auf die Expression von diversen Neuropeptiden, v.a. SP und Calcitonin Gene related peptid (CGRP) hat (BIRKLEIN und SCHMELZ 2008). SP und CGRP sind Hauptmediatoren im Bezug auf neurogene Entzündungen (BIRKLEIN und SCHMELZ 2008).

Schmerzen im Gelenk sind häufig die Folge einer Sensibilisierung der Nozizeptoren durch eine vorherrschende Entzündung (SCHAIBLE et al. 2009). Alle Gelenkstrukturen außer Knorpelgewebe besitzen Nozizeptoren und Nervenfasern, die den Schmerz weiterleiten. In gesunden Geweben besitzen diese Schmerzrezeptoren eine hohe Reizschwelle, so dass normale, alltägliche Bewegungen nicht als schmerzhaft wahrgenommen werden. Besteht jedoch eine Entzündung im Gelenk, kann die Reizschwelle der Rezeptoren sehr stark herabgesetzt sein (SCHAIBLE et al. 2009). Diese Sensibilisierung kann durch verschiedene Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, PGE2 und I2, Serotonin, SP und Neuropeptid Y hervorgerufen werden (SCHAIBLE et al. 2006). In einigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass BTA die zuvor stimulierte SP (LUCIONI et al. 2008, PURKISS et al. 2000) und die CGRP Freisetzung (LUCIONI et al. 2008; RAPP et al. 2006, DURHAM et al. 2004) bei Modellen akuter und chronischer Entzündung reduzierte. In der Humanmedizin wurde ein schmerzreduzierender Effekt von lokalen oder intramuskulären BTA Injektionen in verschiedenen Kontrollstudien an Patienten mit Schulterschmerzen nach Schlaganfall, chronischem „Tennisarm“ und diabetischem neuropatischem Schmerz beschrieben (KEIZER et al. 2002; MARCO et al. 2007; YUAN et al. 2009). Intraartikuläre Injektionen von BTA bewirkten bei Patienten mit Schmerzen aufgrund von OA in Schulter oder Knie ebenfalls eine deutliche Schmerzreduktion (randomisierte Kontrollstudien) (SINGH et al. 2010; BOON et al. 2010). Die chemische Denervation hält einige Monate an. Erst durch die Entstehung neuer Nervenendigungen kommt es zu erneuter Erregungsübertragung und Muskelaktivität (SCHANTZ und JOHNSON 1992).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 OX7-Saporin- Injektion

3.1.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Alle genehmigungspflichtigen, tierexperimentellen Eingriffe wurden im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsvorhabens mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-66-07 vom 09.07.2007 durchgeführt.

Für die Versuche wurden drei gesunde, weibliche Beagle im Alter von acht bis zehn Jahren aus der Tierhaltung- Tierzucht- GmbH in Dorfen genutzt. Die verwendeten Hunde gingen aus einem Langzeitversuch hervor (Aktenzeichen 6/02). Ihnen wurden keine dauerhaften Schäden oder Leiden zugeführt. Da das Projekt abgeschlossen war, sollten die Tiere im vorliegenden Versuchsvorhaben abschließend genutzt werden.

Hund I:

Rasse:	Beagle
Geschlecht:	weiblich
Gewicht:	11,6 kg
Alter:	8 Jahre

Hund II:

Rasse:	Beagle
Geschlecht:	weiblich
Gewicht:	13,7 kg
Alter:	10 Jahre

Hund III:

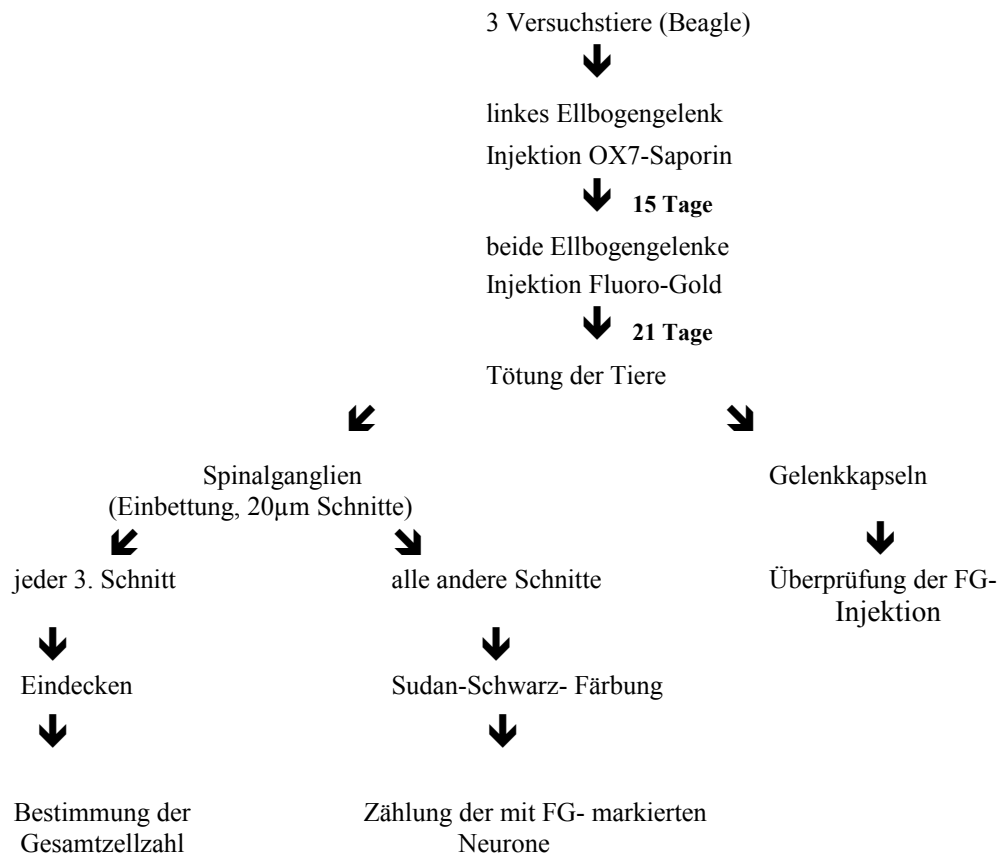
Rasse:	Beagle
Geschlecht:	weiblich
Gewicht:	17,9 kg
Alter:	9 Jahre

Die Versuche wurden von Dr. Peter Böttcher im Zentrum für Präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar der Tierärztlichen Universität München, Ismaninger Straße 22, 81675 München, durchgeführt.

Die Hunde wurden in speziellen Tierhaltungsräumen (personenlimitierte Zutrittskontrolle, Pflege durch ausgebildete Versuchstierpfleger, Temperatur und Luftfeuchte reguliert, Hell/Dunkel- Lichtprogramm mit Dämmerlichtphasen) unter konventionellen Hygienebedingungen gehalten. Es wurde Bodenhaltung (Gummiboden mit Schlafdecken) genutzt. Der Hundehaltungsbereich konnte in verschieden große Buchten unterteilt werden, so dass eine Gruppenhaltung der drei Tiere möglich war. Pro Hund standen ca. 3 m² für

die Dauerhaltung zur Verfügung. Die Fütterung erfolgte mit handelsüblichem Hundefutter (Dosen und Trockenfutter; portioniert). Frisches Leitungswasser wurde täglich über Wassernäpfe ad libitum bereitgestellt. Die Haltung der Tiere erfolgte in Umsetzung der in der EU- Richtlinie 86/609 festgelegten Bedingungen.

3.1.2 Versuchsdurchführung



Zu Beginn der Versuchsdurchführung am 14.08.2008 wurde eine Eingangsuntersuchung mit Erhebung des Gesundheitsstatus durchgeführt. Eine allgemein klinische, spezielle neurologische und orthopädische Untersuchung der Tiere wurde vorgenommen. Zudem wurden jedem Hund Blutproben (4 ml Serum/Plasma) entnommen.

a) Narkose

Zur Narkose für die intraartikuläre Injektion von OX7-Saporin wurde Midazolam (Dormicum[®], Roche, Pharma AG) und Propofol (Narkofol[®], CP-Pharma) intravenös bis zur Intubationsfähigkeit verwendet. Die Dosierung betrug 1 mg/kg KM für Midazolam und 4 mg/kg KM für Propofol. Danach folgte die orotracheale Intubation und die Fortführung mit einer Inhalationsnarkose (Isofluran in Sauerstoff) bei Spontanatmung. Narkosetiefe, Atem-, Herz-, und Kreislaufparameter wurden kontinuierlich mit Pulsoxymetrie, Kapnometer und EKG überwacht.

b) Intraartikuläre Injektion von OX7-Saporin und Nachbehandlung

Das linke Ellbogengelenk wurde aseptisch vorbereitet. Danach wurde eine Injektionskanüle in den kaudolateralen Gelenkrezessus eingebracht. Zur Bestätigung der intraartikulären Position der Kanüle wurde Synovia aspiriert. Es erfolgte die intraartikuläre Injektion von OX-7 Saporin in einer Dosierung von 100 µg/Gelenk, gelöst in 0,5 ml phosphatgepuffertem NaCl.

Es erfolgte keine prophylaktische Applikation von Analgetika. Der Grad der Lahmheit, der Ausdruck einer Nebenwirkung durch die intraartikuläre Applikation sein kann, wurde im Anschluss an die Aufwachphase adspektorisch beurteilt. Im Falle einer hochgradigen Lahmheit (keine Belastung der betroffenen Gliedmaße) war die Applikation von NSAIDs (Carprofen oder Meloxicam), in therapieresistenten Fällen die Applikation von Buprenorphin vorgesehen. Bei einer mittelgradigen Lahmheit bis 6 h nach der Injektion sollten keine Schmerzmittel verabreicht werden. Bestand danach eine mittelgradige Lahmheit, war die Applikation von NSAIDs vorgesehen. Die genaue Menge, die zeitlichen Intervalle und der Grad der Lahmheit wurden detailliert dokumentiert. Direkt im Anschluss an die Injektion und in der Folge für 4 Stunden erfolgte stündlich ein kompletter klinischer und labordiagnostischer Check des Gesundheitszustandes der Tiere. Dazu wurden je 4 ml Blut (Serum/Plasma) entnommen.

Über 4 Wochen post injektionem erfolgte jeden Morgen eine komplette klinische Untersuchung. Insbesondere wurde die Belastung der linken Gliedmaße beurteilt. Zudem erfolgte jede Woche eine komplette orthopädische und neurologische Untersuchung und zudem ein labordiagnostischer Check (Blutentnahme: 4 ml Serum/Plasma). Die allgemeine klinische Untersuchung beinhaltete die Adspektion des Haarkleides und der Hautoberfläche, die Hautelastizität und – temperatur, die Untersuchung der inneren Körpertemperatur, des Auges, der Nase, der Maulhöhle, der oberen Halsgegend und der Lymphknoten. Ebenso wurden Herz- und Atemfrequenz gemessen und das Abdomen durchtastet. Bei der orthopädischen Untersuchung wurde das Gangbild adspektorisch analysiert und auf Lahmheiten geachtet, welche in geringgradig (Lahmheit sichtbar, aber Gliedmaße wird immer belastet), mittelgradig (Gliedmaße wird nicht stetig belastet) und hochgradig (keine Belastung der Gliedmaße) unterteilt wurden. Im Stehen wurde auf die Symmetrie der Muskulatur und Umfangsvermehrungen der Gelenke geachtet. Die Palpation der Gliedmaße erfolgte von distal nach proximal und es wurde auf Schwellungen, Schmerzreaktionen, Instabilitäten und Krepitationen geachtet.

c) Intraartikuläre Injektion von Fluoro- Gold

Die intraartikuläre Injektion von FG erfolgte 15 Tage nach OX7-Saporin Applikation. Damit OX7-Saporin axonal aufgenommen und retrograd transportiert werden kann, ist diese Wartezeit notwendig.

Ziel der Injektion von dem axonalen Tracer FG war die Markierung der sensiblen Gelenkafferenzen in beiden Ellbogengelenken. Dieser Eingriff war nötig, um später histologisch die Anzahl der Neurone in den Dorsalganglien der behandelten linken Seite, im Vergleich zur nicht behandelten rechten Seite quantifizieren zu können. 15 Tage nach Injektion von OX7-Saporin erfolgte eine einmalige FG Injektion in beide Ellbogengelenke (je 4,5 mg FG (Firma: Fluorochrome) in 0,25 ml NaCl) unter Allgemeinnarkose. Die Einleitung erfolgte wieder mit 1 mg/kg KM Midazolam (Dormicum®, Roche Pharma AG) und 4 mg/kg KM

Propofol (Narkofol®, CP-Pharma) und die Erhaltung der Narkose mit Isofluran. Die Applikationstechnik von FG entsprach exakt der Technik, mit der OX7-Saporin in das linke Ellbogengelenk injiziert wurde. Allerdings wurde das FG in beide Ellbogengelenke injiziert. Das rechte Gelenk diente als Kontrolle für das mit OX7-Saporin behandelte linke Ellbogengelenk.

d) Tötung der Tiere

Fünf Wochen nach der OX7-Saporin Injektion bzw. drei Wochen nach FG Injektion wurden alle drei Tiere erneut in Vollnarkose gelegt. Das Vorgehen entsprach dem bei der vorherigen Behandlung. In Vollnarkose wurden die Hunde transkardial mit 4 L 0,9% NaCl Lösung und danach mit 4 L 4% Paraformaldehydlösung in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2) perfundiert. Nach Feststellung des Todes wurden beide Ellbogengelenke und die Dorsalganglien beider Seiten im Bereich der Hals- bzw. Brustwirbelsäule (C4-Th3) entnommen und der histologischen Aufbereitung zugeführt.

3.1.3 Histologische Untersuchungen

a) Vorbereitung der Präparate

Im Rahmen der Vorbereitungen für die durchgeführte Auswertung der Präparate wurden die Proben im Labor des Veterinär-Anatomischen Instituts der Universität Leipzig folgendermaßen bearbeitet: Bis zur weiteren Aufbereitung verblieben die Ganglien und die Gelenke in 4%iger Formalinlösung. Die Ganglien wurden dann im Jahr 2008 zur Einbettung in Einbettkassetten (MEDITE) verbracht und gekennzeichnet. Die Einbettung und die Herstellung von Paraffinschnitten der Gelenkkapseln wurde im Rahmen einer Projektarbeit von einer Studentin im Jahr 2011 durchgeführt.

Die Paraffineinbettung der Ganglien erfolgte nach folgendem Protokoll:

Einbettung:

Wässerung	8	Stunden
70% Ethanol	16	Stunden
80% Ethanol	8	Stunden
90% Ethanol	16	Stunden
96% Ethanol	1,5	Stunden
100% Ethanol	1,5	Stunden
Isopropanol 1	2	Stunden
Isopropanol 2	18	Stunden
Essigsäurebutylester 1	2	Stunden
Essigsäurebutylester 2	2	Stunden
Histoplast 1	2	Stunden im Wärmeschränk bei 60°C
Histoplast 2	2	Stunden im Wärmeschränk bei 60°C
Histoplast 3	15	Stunden im Wärmeschränk bei 60°C

Anschließend wurden die Proben in mit flüssigem Paraffin gefüllte Silikonbettformen verbracht. Die Proben wurden bis zur Aushärtung des Paraffins bei Raumtemperatur gelagert.

Aufblocken

Zur Befestigung der Proben am Mikrotom wurden die ausgehärteten Paraffinproben auf kleinen Holzblöcken fixiert.

Die Paraffineinbettung der Gelenkkapseln erfolgte innerhalb von 24 Stunden automatisch in dem Einbettautomaten „Histokinette“. Nach dem Ausbetten wurden die Präparate auf kleine Plastischalen aufgebracht.

Zur Ermittlung der optimalen Schnittdicke für die quantitative Analyse wurden im Jahr 2008 von den Ganglien C7 und C8 aller Tiere 7 µm dicke Schnitte angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Diese Schnittdicke wird üblicherweise bei Paraffinschnitten verwendet. Für unsere Auswertung waren die Schnitte jedoch zu dünn, da viele Neurone einen Durchmesser von 60 bis 100 µm hatten. Daraufhin wurde die Schnittdicke auf 20 µm erhöht. Die Toluidinblaufärbung wurde nur an den Schnitten der Ganglien C7 und C8 durchgeführt.

Somit wurde für die weitere histologische Auswertung von allen anderen Ganglien der rechten Seite und von Th1 und Th2 der linken Seite 20 µm dicke Schnitte unter Verwendung eines Schlittenmikotoms (Leica SM 2000R) hergestellt und auf Objektträger aufgebracht. Jeder dritte angefertigte Schnitt wurde direkt nach der Trocknung mit Histokitt (ROTI-Histokitt) und einem Deckgläschen eingedeckt.

Da die für unseren Versuch verwendeten Hunde bereits zwischen 8 und 10 Jahren alt waren, zeigten sich in allen untersuchten Schnitten starke Einlagerungen des Alterspigmentes „Lipofuszin“. Dieses Pigment erschwert durch sein ähnliches spektrales Verhalten wie FG die Auswertung des Farbstoffes (Lipofuszin: Emission 430 nm; FG: Emission: 410- 565 nm). Sowohl FG als auch Lipofuszin erscheinen in der Fluoreszenzmikroskopie goldgelb und sind als feine Partikel im Zytoplasma der Neurone eingelagert. Trotz Einsatz eines Spezial-Filters, der eine Transmission von 519 – 700nm besitzt, war die Autofluoreszenz durch Lipofuszin so stark, dass eine Unterscheidung zu FG- Markierungen nicht möglich war. Daher wurden alle bisher nicht eingedeckten Schnitte mit dem Farbstoff „Sudan-Schwarz“ gefärbt, welcher in der Lage ist, die Fluoreszenz durch Lipofuszin zu unterdrücken ("Quentsching").

Die Abbildungen 10, 11, 12 und 13 zeigen jeweils Schnitte ohne und mit "Quentsching" durch Sudan-Schwarz.

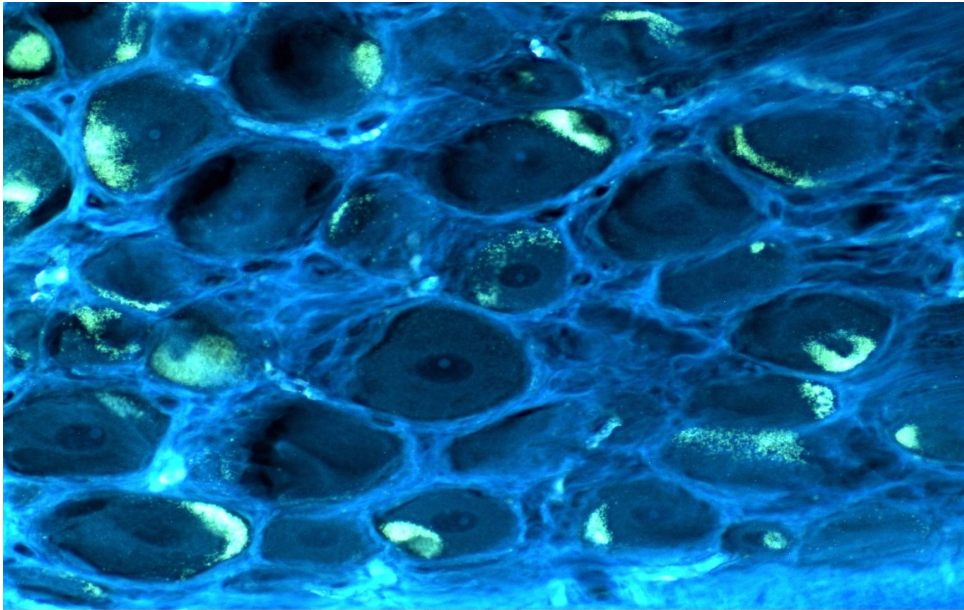


Abb. 10: Ausschnitt vor dem "Quentsching" mit Sudan- Schwarz, viel Autofluoreszenz ist erkennbar

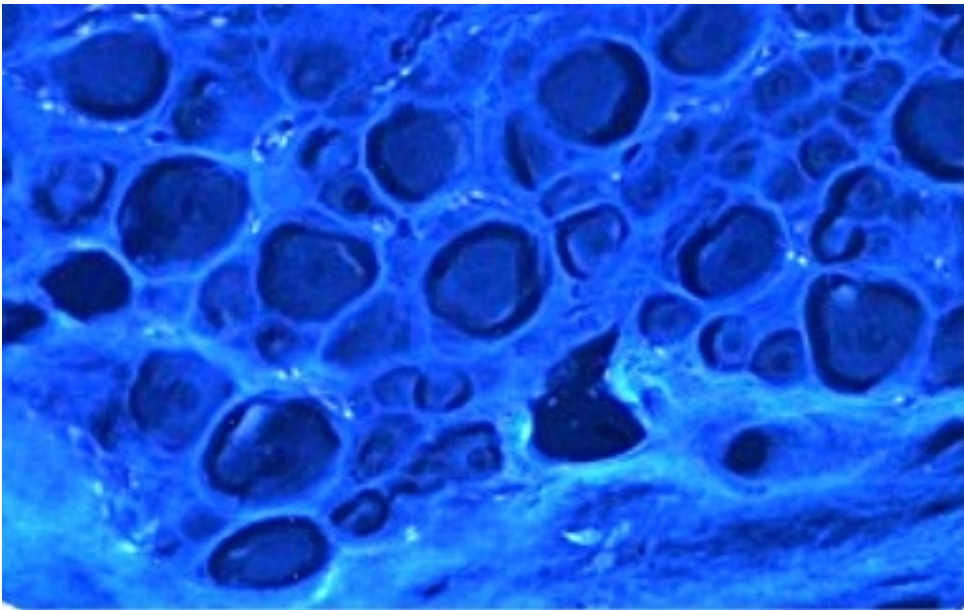


Abb. 11: Ausschnitt nach dem "Quentsching" mit Sudan- Schwarz; keine intrazelluläre Autofluoreszenz ist mehr sichtbar

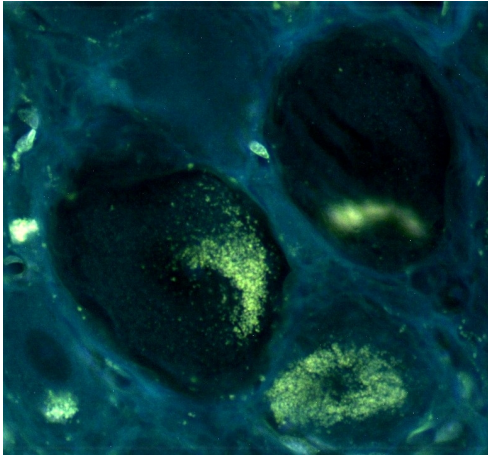


Abb. 12: Zellen mit Einlagerung goldgelber Autofluoreszenz durch Lipofuszin

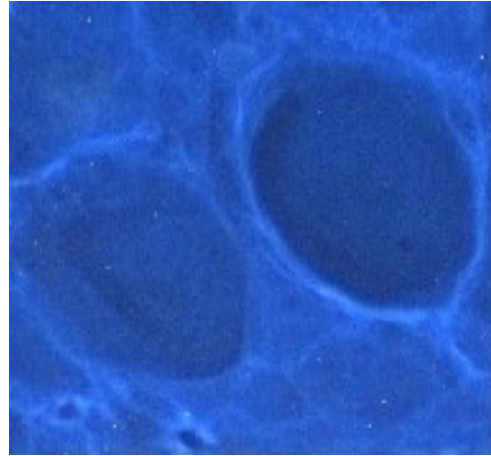


Abb. 13: Derselbe Schnitt nach "Quentsching" der Autofluoreszenz durch Sudan- Schwarz

Nach dieser Färbung wurden diese Schnitte ebenfalls eingedeckt und analysiert.

Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Sudan-Schwarz-Färbung:

- | | |
|---|--------|
| - Spülen in Aqua dest. | kurz |
| - 70%iger Alkohol | kurz |
| - 1%ige Sudan-Schwarz-B-Lösung
(in 70%igem Alkohol gelöst) | 10 min |
| - 70%iger Alkohol | kurz |
| - 7%iger Alkohol | 5 min |
| - spülen in Aqua dest. | kurz |

Bis zur Auswertung wurden die Präparate lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Um definitiv zu klären, dass es sich bei der starken Fluoreszenz um Lipofuszin handelt, wurde im Veterinär-Physiologisch- Chemischen Institut der Universität Leipzig ein biochemische Nachweis von Lipofuszin durchgeführt. Im Paul-Flechsig Institut Leipzig wurde ein Antikörpernachweis von FG durchgeführt. Beide Versuche ergaben eindeutig, dass in vielen Neuronen eine starke Autofluoreszenz auftrat.

In unserem Versuch gab es keine Kontrollgruppe, da das rechte Gelenk ohne OX7-Saporin die Kontrolle zur linken Seite war. Nachdem die starke Autofluoreszenz nachgewiesen war, wurden die Spinalganglien zwei weiterer Hunde zur Kontrolle herangezogen. In den Spinalganglien eines 8 Monate alten Beagle, der aus einem anderen Tierversuch stammte, und mit unserem Filter untersucht wurde, konnte kein Lipofuszin detektiert werden, da dies ein Alterspigment ist und sich erst mit zunehmendem Alter einlagert. In den Spinalganglien eines 15 Jahre alten Schäferhundes konnten sehr starke Einlagerungen dieses Pigmentes mit unserem Filtersatz nachgewiesen werden. Dieser Hund hatte keine FG- Applikation erhalten.

b) Histologische Auswertung

Zunächst wurden die ungefärbten, eingedeckten Präparate (jeder dritte Schnitt) zur Bestimmung der Gesamtneuronenzahl ausgewertet. Die Ganglien C7 und C8 konnten bei keinem der Tiere ausgewertet werden. Eine vorherige Messung der Größe der Neuronen ergab, dass die größten Nervenzellen in den Ganglien einen Durchmesser von ca. 60 bis 100 µm hatten. Bei Auswertung jeden Schnittes bestand die Gefahr, ein Neuron mehrmals bei der Zählung zu erfassen. Ist der Abstand zwischen den Schnitten zu groß, wären viele kleine Nervenzellen nicht dokumentiert worden. Daher war die Zählung der Gesamtneuronenzahl in jedem dritten Schnitt ein guter Kompromiss, um mit einem vertretbaren Maß an Arbeit eine optimale Quantifizierung zu erzielen.

Die genutzten Schnitte wurden mithilfe des Improvision- Imaging- Systems, bestehend aus dem ZEISS Axioplan 2 und der Software „Openlab 5.5.0“ der Firma PerkinElmer gescannt. In dem Mikroskop befand sich ein Spezialfilter für FG (Transmission 519-700 nm), der zur Analyse der FG- Markierungen beschafft worden ist.

Es wurde eine definierte Fläche im Präparat festgelegt, die mit dem Programm „Openlab“ abgescannt wurde. Die Fläche des jeweiligen Ganglion- Schnittes und wurde manuell am Mikroskop eingestellt. Je nach Größe des Schnittes wurden ca. 20 bis 200 Einzelbilder aufgenommen. Je nach Beschaffenheit und Qualität der Schnitte wurden die Parameter „Belichtungszeit, Mode, Gamma, Blacklevel, Whitelevel und Digital Gain“ angepasst, um gut auswertbare Bilder zu erhalten. Die genauen Werte sind den Tabellen 1 bis 3 zu entnehmen.

Hund I

Ganglien	Belichtungszeit	Mode	Kontraststärke	Blacklevel	Whitelevel	Digital Gain
C 4 rechts	120 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
C 5 rechts	120 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
C 6 rechts	120 ms	High Quality Color	1	766	15122	X 8
C 7	N.a.					
C 8 rechts	120 ms	High Quality Color	1	2015	16383	X 8
C 8 links	140 ms	High Quality Color	1	2015	16383	X 8
Th 1 rechts	100 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 4
Th 1 links	90 ms	High Quality Color	1	766	15122	X 4
Th 2 rechts	100 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 2 links	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 3 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8

Tab. 1: Übersicht über die eingestellten Scan- Werte

Hund II

Ganglien	Belichtungszeit	Mode	Kontraststärke	Blacklevel	Whitelevel	Digital Gain
C 4 rechts	610 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
C 5 rechts	800 ms	High Quality Color	1	783	15122	X 8
C 6 rechts	300 ms	High Quality Color	1	783	15122	X 8
C 7	N.a.					
C 8 rechts	2500 ms	High Quality Color	1	2015	16383	X 8
C 8 links	740 ms	High Quality Color	1	2015	16383	X 8
Th 1 rechts	500 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 4
Th 1 links	476 ms	High Quality Color	1	766	15122	X 4
Th 2 rechts	600 ms	High Quality Color	1	783	15122	X 8
Th 2 links	800 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 3 rechts	800 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8

Tab. 2: Übersicht über die eingestellten Scan- Werte

Hund III

Ganglien	Belichtungszeit	Mode	Kontraststärke	Blacklevel	Whitelevel	Digital Gain
C 4 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
C 5 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
C 6 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
C 7	N.a.					
C 8 rechts	150 ms	High Quality Color	1	2015	16383	X 8
C 8 links	150 ms	High Quality Color	1	2015	16383	X 8
Th 1 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 1 links	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 2 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 2 links	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8
Th 3 rechts	90 ms	High Quality Color	1	754	15122	X 8

Tab. 3: Übersicht über die eingestellten Scan- Werte

Das Computerprogramm AutoPanoPro V1.4.2 setzte die Einzelbilder nach exakter Berechnung wieder zusammen, so dass ein Bild des kompletten Ganglion- Schnittes auf dem Computer entstand. Die fertigen Bilder wurden im JPG Format gespeichert. Diese Bilder wurden dann mit dem Programm „Volocity“ der Firma PerkinElmer geöffnet. In den genannten Schnitten wurde die Gesamtneuronenzahl pro Schnitt ermittelt.

Nach der Färbung mit Sudan-Schwarz wurden diese Schnitte ebenfalls mit dem oben genannten System analysiert und die noch vorhandenen goldgelben Fluoreszenz- Markierungen der Neurone gezählt. Da diese deutlich goldgelben, granulären Markierungen nicht mit Sudan-Schwarz "gequentscht" waren, stammen diese eindeutig von der FG- Applikation.

Zum Vergleich mit der linken Seite wurden die Ganglien Th1 und Th2 ausgewählt. Die Vorgehensweise entsprach jener der rechten Seite. Die Paraffinschnitte der Gelenkkapseln wurden ebenfalls mit dem Improvision- System ausgewertet.

3.1.4 Material, Chemikalien, Geräte

a) Geräte und Laborhilfsmittel

- Einbettkassetten (MEDITE)
- Objektträger (MENZEL GLÄSER)
- Deckgläschen (MENZEL GLÄSER)
- Schlittenmikrotom (LEICA SM 2000R)
- ZEISS Mikroskop „Axioskop“
- ZEISS Mikroskop „Axiophot“
- Improvisation- Imaging- System, bestehend aus dem ZEISS Axioplan 2 und den Programmen Volocity und Openlab der Firma PerkinElmer
- Computerprogramm AutoPanoPro V1.4.2
- Einbettautomat „Histokinette“, Armin Ludi, Bern

b) Chemikalien

- Versuch:

OX7-Saporin OX7-Saporin (drei Dosen à 100 µg wurde von der Firma „Advanced Targeting Systems, San Diego CA, USA“ zur Verfügung gestellt). Das Toxin wird gefroren bei einer Temperatur von –80°C angeliefert und vor der weiteren Verarbeitung langsam aufgetaut.

Fluoro- Gold Fluoro- Gold wurde als Pulver von der Firma „Fluorochrome, LLC, Denver, Colorado, USA“ geliefert. Das Pulver wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Dunkeln gelagert. In einer Apotheke wurde nach Herstellervorgaben eine gebrauchsfertige Lösung hergestellt (4,5 mg Fluoro-Gold in 0,25 ml NaCl)

- Aufbereitung der Präparate

Die Fixierung erfolgte in 4%iger Formalinlösung

- Einbettung

Paraffin (Vogel Histo Comp, VOGEL)

- Färbung

Sudan-Schwarz B (Dr. K. Hollborn & Söhne GmbH & Co KG)

- Weitere Chemikalien

ROTI-Histokitt (Carl Roth GmbH + Co. KG)

3.2 Capsaicin- Injektion

Die Behandlung eines Hundes mit Capsaicin bei der Therapie der Ellbogengelenksarthrose hat zum Ziel, durch eine Applikation in das Gelenk eine weitgehende Schmerzf়reiheit zu erzielen. Da diese Behandlung in der Humanmedizin in vielen in vivo Studien zu einer langanhaltenden Schmerzreduktion geföhrt hat, liegt die Vermutung nahe, dass eine solche Behandlung auch in der Veterinärmedizin erfolgreich sein könnte.

Es wurden zwei an Arthrose erkrankte Hunde in der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig im Rahmen eines Therapieversuches mit Capsaicin behandelt und der weitere Verlauf der Erkrankung dokumentiert. Bei beiden Tieren konnte mittels verfügbarer Tierarzneimittel keine zufriedenstellende Besserung der Lahmheit erreicht werden. Die Besitzer wurden über die Behandlung, Risiken und mögliche Nebenwirkungen aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung, dass ihr Tier mit dem Wirkstoff behandelt werden darf.

3.2.1 Tiere und deren klinische Befunde

Hund I:

Rasse:	Deutscher Schäferhund
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	40,2 kg
Alter bei Vorstellung:	9 Jahre
Grund der Vorstellung:	- Lahmheit linke Vordergliedmaße seit ca. 6 Wochen
Klinische Untersuchung:	- deutlich geringgradige Lahmheit linke Vordergliedmaße - Coronoidprobe links positiv
Röntgen- Befunde:	- hochgradige Arthrose - Verdacht auf FCP

Hund II:

Rasse:	Deutscher Schäferhund
Geschlecht:	weiblich, kastriert
Gewicht:	45,5 kg
Alter bei Vorstellung:	8 Jahre
Grund der Vorstellung:	- Lahmheit vorn links seit 6 Monaten, die sich bei Belastung verschlimmert - keine Besserung unter Schmerzmitteln
Klinische Untersuchung:	- mittelgradige Lahmheit vorn links - Ellbogen links umfangsvermehrt - Krepitation - starkes Übergewicht
Röntgen- Befunde:	- hochgradige Arthrose - Verdacht auf FCP

3.2.2 Durchführung der Behandlung

Hund I:

Die Injektion von Capsaicin erfolgte unter Allgemeinanästhesie mit 0,5 mg/kg Diazepam (Faustan®, Temmler Pharma) i.v., 0,2 mg/kg Levomethadonhydrochlorid (L-Polamivet®, Intervet) i.v., 0,02 mg/kg Atropinsulfat (Atropin®, B. Braun Melsungen AG) i.v. sowie 0,3 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2%®, Albrecht) in Kombination mit 3 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pfizer) i.v. Die Erhaltung der Narkose erfolgte mit Isofluran als Inhalationsnarkose. Die Behandlung dauerte ca. 35 Minuten.

Zunächst erfolgte eine kaudo- laterale Gelenkpunktion des linken Ellbogengelenks mit Aspiration von Synovia zur Kontrolle. Es wurden 1,5 ml Lidocain 2% in das Gelenk injiziert. Die Kanüle blieb während der Wartezeit im Gelenk, dann wurde nach ca. 5 Minuten das Lidocain wieder abgesaugt und 1,5 ml Capsaicinlösung (Wirkstoff: 250 mg Capsaicin) injiziert.

Danach erfolgte über 15 Minuten die Kontrolle der Kreislaufparameter, um eventuelle systemische Nebenwirkungen des Capsaicins zu erkennen.

Hund II:

Die Injektion von Capsaicin in das linke Ellbogengelenk erfolgte unter Allgemeinanästhesie. Der Hund erhielt intravenös 0,5 mg/kg Diazepam (Faustan®, Temmler Pharma), 0,2 mg/kg Levomethadonhydrochlorid (L-Polamivet®, Intervet), 0,02 mg/kg Atropinsulfat (Atropin®, B. Braun Melsungen AG) sowie 0,3 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2%®, Albrecht) in Kombination mit 3 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pfizer). Die Erhaltung der Narkose erfolgte als Inhalation mit Sevofluran. Die Dauer der Behandlung betrug ca. 1 Stunde.

Es erfolgte eine kaudo- laterale Gelenkpunktion und die Aspiration von Synovia, um den Sitz der Kanüle zu kontrollieren. Danach wurden 5 ml Lidocain 2% in das Gelenk injiziert. Ca. 5 Minuten später wurde das Lidocain entfernt, um die Gelenkkapsel nicht zu überdehnen. Es wurden 0,5 ml Capsaicinlösung (Wirkstoff: 83 mg Capsaicin) in das linke Gelenk eingebracht.

Danach wurden über 20 Minuten die Parameter Herz- und Atemfrequenz, CO₂ Spannung und innere Körpertemperatur kontrolliert.

3.2.3 Wirkstoff

Capsaicin wurde als weißes Pulver von der Firma MOLEKULA GmbH, 31582 Nienburg/ Weser geliefert.

Nach Rezeptierung wurde in der Apotheke der Universität Leipzig eine gebrauchsfertige, aseptische Lösung unter Verwendung folgender Inhaltsstoffe hergestellt:

- Capsaicin	250 mg
- Isot. NaCl Lösung 0,9 %	1,24 ml
- Ethanol 96 Vol-%	0,26 ml
- Tween 80	0,93 g

3.3 Botox- Injektion

3.3.1 Tiere und deren klinische Befunde

Die Behandlung einer Arthrose im Ellbogengelenk mittels Botox wurde an vier klinisch kranken Hunden im Rahmen eines Therapieversuches in der Kleintierklinik der Universität Leipzig von Dr. Peter Böttcher durchgeführt. Da bei allen Tieren keine ausreichende Schmerzreduktion mit den verfügbaren Tierarzneimitteln erreicht werden konnte, war die Umwidmung eines Humanarzneimittels gerechtfertigt. Die Besitzer wurden vor der Behandlung über Risiken und mögliche Nebenwirkungen aufgeklärt und mussten eine Einverständniserklärung unterschreiben.

Hund I:

Rasse:	Terrier-Mischling
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	14,7 kg
Alter bei Vorstellung:	6 Jahre
Grund der Vorstellung:	- Überweisung durch den Haustierarzt zur Abklärung einer Lahmheit der linken Vordergliedmaße
Klinische Untersuchung:	- deutliches Übergewicht - Entlastung der linken Vordergliedmaße im Stand - mittelgradige Lahmheit vorn links, Hund läuft sich aber ein - schmerzhaft bei Extension des linken Ellbogengelenks - keine Stellungsanomalie und keine Krepitation - kein Hinweis auf Seitenbandinstabilität
Röntgen- Befunde:	- geringgradige arthrotische Veränderungen

Hund II

Rasse:	Rauhaar- Teckel
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	12 kg
Alter bei Vorstellung:	12 Jahre
Grund der Vorstellung:	- intermittierende Lahmheit vorn links seit einem Jahr
Klinische Untersuchung:	- mittelgradige Lahmheit vorn links - Krepitation und Dolenz bei Streckung des Ellbogengelenks links - Rotation unauffällig
Röntgen- Befunde:	- geringgradige arthrotische Veränderungen - <i>Radius curvus</i> – dackeltypische Fehlstellung

Hund III

Rasse:	Golden Retriever
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	31,2 kg
Alter bei Vorstellung:	12 Jahre
Grund der Vorstellung:	- Lahmheit rechte Vordergliedmaße und periartikuläre Umfangsvermehrung am rechten Ellbogengelenk
Klinische Untersuchung:	- mittelgradige Lahmheit vorn rechts - ausgeprägte periartikuläre Umfangsvermehrung am rechten Ellbogengelenk - Beuge- und Streckhemmung
Röntgen- Befunde:	- hochgradige Arthrose mit Mineralisation und Verknöcherung der Weichteile

Hund IV

Rasse:	Deutscher Schäferhund- Mischling
Geschlecht:	männlich
Gewicht:	37,5 kg
Alter bei Vorstellung:	9 Jahre
Grund der Vorstellung:	- Überweisung durch den Haustierarzt zur Abklärung einer, seit 2 Jahren bestehenden Lahmheit der linken Vordergliedmaße - ist nach Belastung und nach Ruhe deutlich schlimmer
Klinische Untersuchung:	- mittelgradige Lahmheit vorn links - Wirbelsäule nicht dolent - Ellbogen bei Hyperextension und Flexion schmerzhaft - Coronoidprobe positiv
Röntgen- Befunde:	- mittelgradige Arthrose am linken Ellbogengelenk

3.3.2 Durchführung der Behandlung

Zur Injektion von BTA erhielten alle Hunde eine Kurznarkose mit 0,3 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Xylazin 2%®, Albrecht) in Kombination mit 3 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Pfizer) und 0,02 mg/kg Atropinsulfat (Atropin®, B. Braun Melsungen AG). Das Gelenk wurde aseptisch vorbereitet und es erfolgte eine kaudo- laterale Gelenkpunktion. Danach wurde Synovia aspiriert um den Sitz der Kanüle zu kontrollieren.

In 0,1 ml Lösung waren 10 Einheiten Botox vorhanden.

Hund I, Hund II und Hund III erhielten je 50 Einheiten Botox (entspricht 0,5 ml Lösung) in das erkrankte Gelenk. Hund IV erhielt 100 Einheiten Botox (entspricht 1 ml Lösung).

3.3.3 Wirkstoff

Botulinumtoxin A

Handelsname: Botox

100 Allergan- Einheiten

Pharm- Allergan GmbH

76275 Ettlingen

Germany

Das Toxin wurde als Pulver zur Herstellung einer

Injektionslösung in einer Durchstechflasche geliefert.

In die Flasche wurde 1,0 ml unkonservierte, sterile 0,9%ige Natriumchloridlösung zugegeben. Damit erhielt man 10 Einheiten Botox/ 0,1 ml.

4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil wurde in drei Abschnitte gegliedert. Die Ergebnisse nach intraartikulärer Injektion OX7-Saporin und FG- Applikation werden unter 4.1 vorgestellt.

Die Teile 4.2 und 4.3 beschreiben die Befunde nach der intraartikulären Injektion von Capsaicin und Botox.

4.1 OX7-Saporin-Injektion

4.1.1 Histologische Auswertung der Präparate

a) Gesamtneuronenzahl pro Ganglion

Die Ganglien C7 und C8 der rechten und linken Seite war bei den drei Tieren nicht auswertbar, da zu Beginn der Arbeiten eine Schnittdicke von 7 μm gewählt wurde. Eine quantitative Analyse der FG- Markierungen war an diesen dünnen Paraffinschnitten nicht möglich.

Das Ganglion Th1 der rechten und linken Seite von Hund II wurde wahrscheinlich bei der Entnahme beschädigt, wodurch die Randbereiche stark komprimiert wurden und die Zellen in diesen Arealen schlecht auszählbar waren (Abb.14 und 15). Das Ganglion Th3 der rechten Seite dieses Hundes wurde ebenfalls bei der Entnahme beschädigt. Daher waren die Schnitte immer in zwei Hälften geteilt, was beim Scannen und Auswerten Schwierigkeiten bereitete (Abb.16).

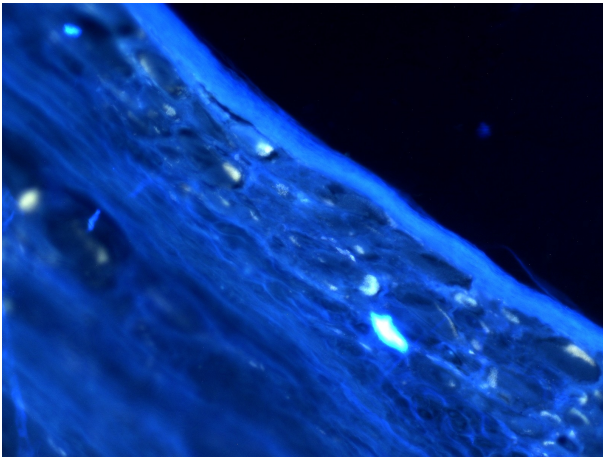


Abb. 14: Hund II, Th1 rechts, komprimierte Randareale

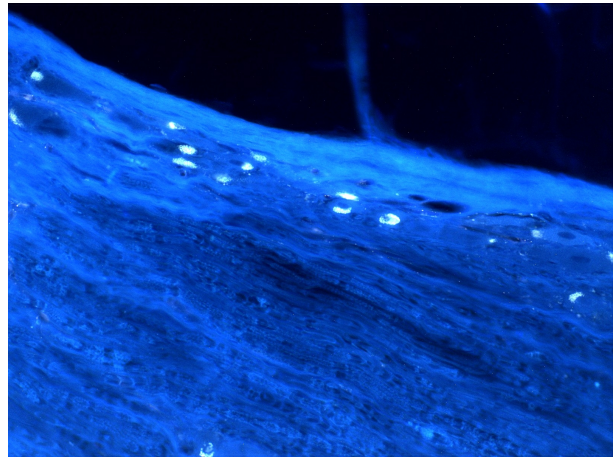


Abb. 15: Hund II, Th1 links, bei der Organentnahme beschädigte Randbereiche

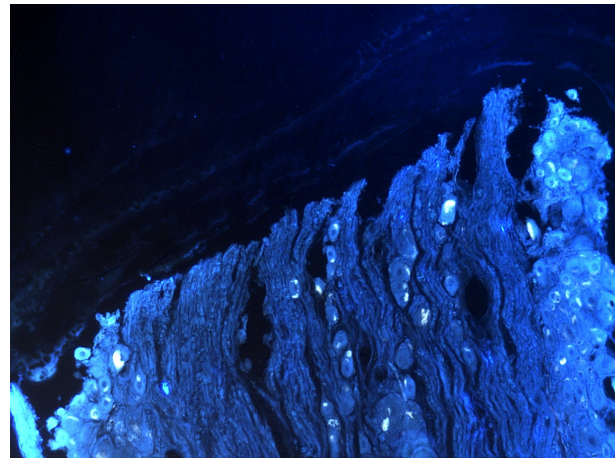
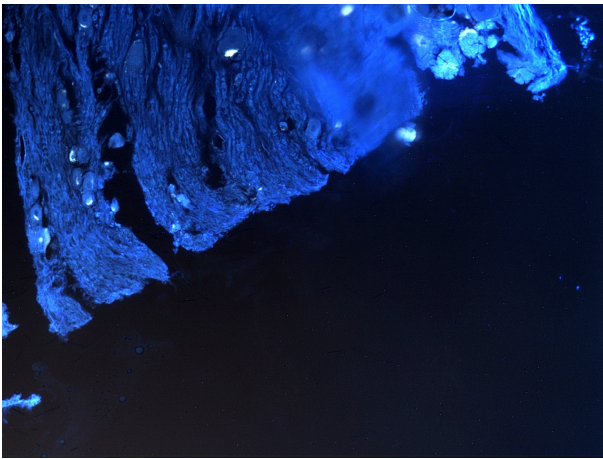


Abb. 16: Hund II, Th3 rechts, in zwei Teile gerissenes Ganglion

obere Teil des Ganglions;

unterer Teil des Ganglions

Zur Bestimmung der Gesamtneuronenanzahl wurden alle Neurone in jedem dritten Schnitt eines Ganglions gezählt. Die Summe dieser gezählten Nervenzellen ergab die Gesamtneuronenanzahl eines Ganglions.

Ganglien	Hund I	Hund II	Hund III
C4 rechts	5700	3950	8858
C5 rechts	6230	8216	7966
C6 rechts	9804	7191	7347
C7 rechts	n.a.	n.a.	n.a.
C8 rechts	n.a.	n.a.	n.a.
Th1 rechts	10172	6881	13652
Th1 links	11686	6192	13120
Th2 rechts	6275	3735	5473
Th2 links	5961	5800	5145
Th3 rechts	4120	5168	4389

Tab. 4: Gesamtanzahl der Neurone in den Spinalganglien

Zum Vergleich der Ganglien beider Seiten wurden die Thorakalganglien Th1 und Th2 ausgewählt

Die Gesamtanzahl der Neurone pro Ganglion variiert zwischen den Hunden trotz einheitlicher Messung, gleicher Rasse und gleichen Geschlechts sehr stark. Eine statistische Auswertung ist bei einer Versuchsgruppengröße von $n=3$ nicht möglich.

Th1 ist bei Hund I und Hund III mit über 10000 Neuronen pro Ganglion eines der größten untersuchten Ganglien.

b) FG- markierte Ganglionzellen

Die Zählung der mit FG markierten Neurone pro Ganglion erfolgte an den mit Sudan-Schwarz gefärbten Schnitten, da dieser Farbstoff die Autofluoreszenz durch Lipofuszin "quentschen" kann, während die FG-

Markierungen deutlich sichtbar bleiben. Abb. 17 zeigt ein Präparat ohne FG- Markierungen nach der Fett-Färbung. Abb. 18 zeigt zwei mit FG markierte Neurone nach dem "Quentsching" mit Sudan-Schwarz.

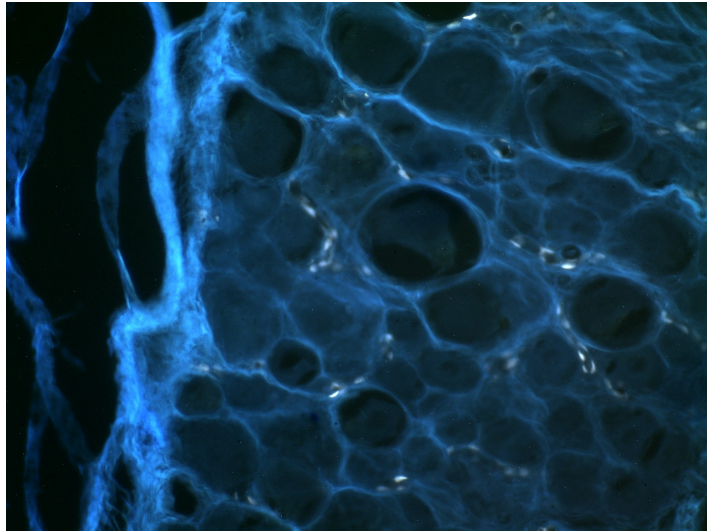


Abb. 17: Mit Sudan-Schwarz gefärbtes Präparat ohne FG- Markierungen

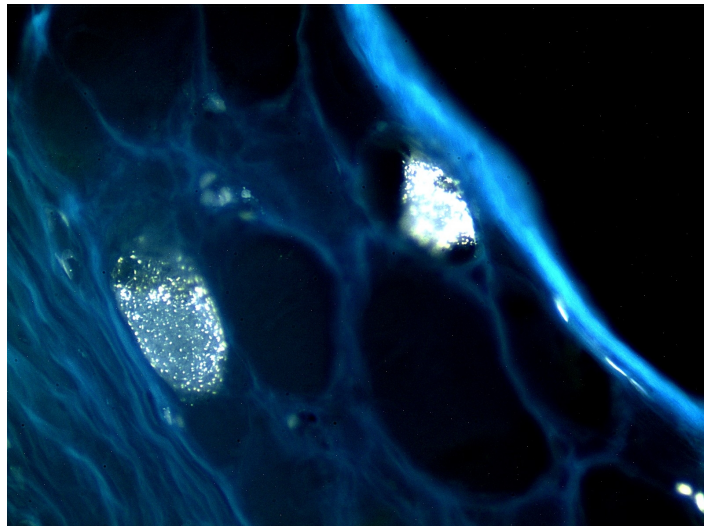


Abb. 18: Sudan-Schwarz gefärbtes Präparat mit zwei Neuronen, deren Zytoplasma eine deutliche FG- Markierung enthält

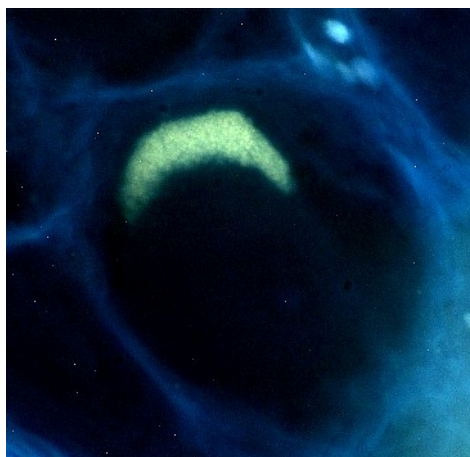


Abb. 19: Sudan- Schwarz gefärbtes Präparat mit einer retrograd mit FG markierten Nervenzelle

Ganglien	Hund I	Hund II	Hund III
C4 rechts	0	0	0
C5 rechts	0	0	0
C6 rechts	5	10	3
C7 rechts	n.a.	n.a.	n.a.
C8 rechts	n.a.	n.a.	n.a.
Th1 rechts	1	2	8
Th1 links	1	0	2
Th2 rechts	0	0	0
Th2 links	0	0	0
Th3 rechts	0	0	0

Tab. 5: Anzahl der retrograd mit FG markierten Neurone in den Spinalganglien

Zum bilateralen Vergleich der Markierung wurden die Ganglien Th1 und Th2 ausgewählt

Tabelle 5 zeigt, dass nur sehr wenige Neurone der Ganglien C6 und Th1 retrograd mit dem Fluoreszenzfarbstoff FG markiert worden sind. Die Anzahl markierter Neurone liegt zwischen einer und zehn von mehreren tausend Nervenzellen und ist damit im Vergleich zur Gesamtzahl der Neurone außerordentlich gering. Eine Ursache für die außerordentlich geringe Anzahl von mit FG markierten Neuronen ist wahrscheinlich eine zu geringe Konzentration des intraartikulär applizierten Fluoreszenzfarbstoffes.

OX7- Saporin ist ein potentes Zellgift, dass nach intraartikulärer Injektion in das linke Ellbogengelenk die zervikalen und thorakalen Ganglienzellen zerstören sollte, deren Axone das Ellbogengelenk sensibel innervieren.

Nach 14 Tagen wurden FG in das rechte und linke Ellbogengelenk appliziert. Eine Markierung der Ganglienzellen mit FG auf der linken Seite war nach der intraartikulären Injektion des Neurotoxins OX7- Saporin nicht zu erwarten. Eine Degeneration der Neurone der linken zervikalen bzw. thorakalen Ganglienzellen konnte jedoch bei keinem der Beagle beobachtet werden. Mögliche Ursache für die ausbleibende Neurodegeneration nach OX7- Saporin Applikation in den linken Ganglien werden in der Diskussion genannt.

c) Nachweis der FG- Markierungen in den Gelenken

Die Gelenkkapsel wurde im Hinblick auf das Vorhandensein von FG- Granula im Rahmen einer Projektarbeit von einer Studentin untersucht. Im Bereich der Gelenkkapsel konnten zahlreich goldgelbe Granula dokumentiert werden. Dabei kann es sich nur um FG- Granula handeln, da sich Lipofuszin nur im Zytoplasma der Perikarya einlagert und nicht in den Axonen. Weiterführende Untersuchungen dieser Gelenke sind Gegenstand einer anderen Arbeit.

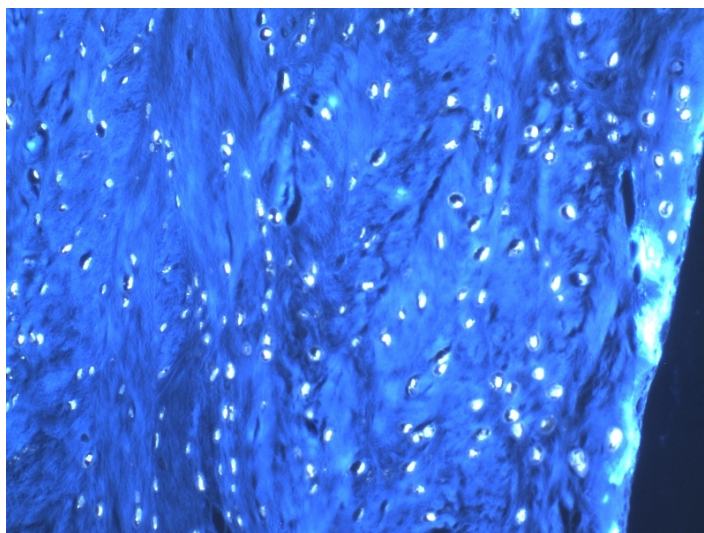


Abb. 20: Zahlreiche FG- Granula bedecken diesen Anteil der dorsalen Synovialmembran, *Stratum synoviale*, aus dem linken Ellbogengelenk eines Beagle

4.1.2 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

Die klinische und orthopädische Untersuchung der Beagle vor Versuchbeginn ergab, ebenso wie die labordiagnostische Untersuchung keinerlei Auffälligkeiten. Röntgenbilder der Ellbogengelenke wurden nicht angefertigt.

Nach der intraartikulären Injektion von OX7- Saporin konnte bei allen drei Hunden eine mittelgradige Lahmheit der linken Vordergliedmaße festgestellt werden. Bei Hund II war die Ellbogenregion dezent warm und zeigte Schmerzreaktionen bei Extension des Gelenkes. Die Behandlung der Lahmheiten erfolgte bei allen Hunden mit 4 mg/kg KM per os Carprofen (Rimadyl®, Pfizer) und 10 mg/kg KM per os Metamizol, (Metapyrin®, Serumwerk Bernburg AG). Eine Schwellung des Ellbogengelenks wurde bei keinem der Tiere beobachtet. Am nächsten Tag war bei Hund I und Hund II eine geringgradige Besserung der Lahmheit zu erkennen. Sie wurden wie oben beschrieben weiter behandelt. Bei Hund III war die Lahmheit unverändert. Das Tier erhielt als Schmerzmittel Buprenorphin, Dosierung 0,01 mg/kg KM s.c. (Temgesic®, RB Pharmaceuticals Ltd). In den nächsten Tagen wurde eine zunehmende Belastung der Gliedmaßen bei allen Hunden beobachtet. Fünf Tage nach der OX7-Saporin Injektion war keine Lahmheit mehr vorhanden und die Medikamenten wurden abgesetzt.

Die Hunde zeigten zu keinem Zeitpunkt nach der Operation Fieber oder Wesensveränderungen.

Die Laboruntersuchung zeigte bei allen Hunden am Tag des Eingriffes einen niedrigen Glucosespiegel. Ebenfalls auffällig war ein leichter Anstieg der Leukozytenzahlen nach der OX7- Saporin Injektion, der sich jedoch meist noch im normalen bis oberen Referenzbereich befand. Die genauen Werte sind in Tabelle 6 dargestellt. Der Referenzwert der Leukozyten liegt bei $6-12 \times 10^9 /l$.

Zeitpunkt der Labor- untersuchung	Hund I	Hund II	Hund III
Vor der OX7-Saporin Injektion	6,7	8,1	7,7
1 h nach OX7-Saporin Injektion	11,6	11,4	9,8
2 h nach OX7- Saporin Injektion	12,3	14,6	12,3
3 h nach OX7-Saporin Injektion	13,8	13,3	11,3
4 h nach OX7- Saporin Injektion	14	13,2	11,1
7 Tage nach OX7- Saporin Injektion	12,7	12,7	13,7
14 Tage nach OX7- Saporin Injektion	9,3	14,7	12
7 Tage nach FG- Injektion	16,7	16,3	10,7
14 Tage nach FG- Injektion	14	16,3	12,4
21 Tage nach FG- Injektion	12,8	10,4	8

Tab. 6: Leukozytenwerte während des Versuches

Nach der intraartikulären Injektion von FG 15 Tage nach der OX7-Saporin Injektion wurden bei keinem der Hunde Lahmheiten, Schwellungen oder Schmerzhaftigkeit festgestellt. Ebenso zeigte die allgemeine klinische Untersuchung keinerlei Auffälligkeiten.

4.2 Capsaicin- Injektion

Nach Capsaicin- Injektion in das Ellbogengelenk wurden die Hunde klinisch untersucht. Der Therapieerfolg wurde zusätzlich mit Hilfe von Röntgenaufnahmen und der Beurteilung des Allgemeinbefindens durch den Besitzer überprüft. Die Einschätzung durch den Besitzer erfolgte mittels eines, von der Klinik erstellten Fragebogens, der sowohl vor, als auch nach der Operation mehrmals ausgefüllt wurde, um den Verlauf der Behandlung zu dokumentieren. Die Fragen betrafen das Allgemeinbefinden des Hundes (Stimmung, Zeichen von Wohlbehagen), die Veränderungen in der Aktivität des Hundes (selbstständiges Spielen oder Bewegen) und deutliche Schmerzzeichen (Schmerzäußerungen, Lahmheiten).

	Hund I	Hund II
Betroffenes Gelenk	Linkes Ellbogengelenk	Linkes Ellbogengelenk
Menge Capsaicin	250 mg	83 mg
Nebenwirkungen nach der Behandlung	Erhöhung von Herz- und Atemfrequenz	Keine
Röntgenbefunde	Hgr. Arthrose Verdacht auf FCP	Hgr. Arthrose Verdacht auf FCP
Bewertung des Erfolges anhand klinisch-orthopädischer Untersuchung	Keine Verbesserung	Keine Verbesserung
Bewertung der Behandlung durch den Besitzer	Keine Verbesserung	Keine Verbesserung

Tab. 7: Befunde nach der Capsaicin Applikation

Hund I:

a) Verlauf nach der Behandlung/ klinische Untersuchungen

Direkt im Anschluss an die Capsaicin- Injektion wurden die Kreislaufparameter des Hundes über einen Zeitraum vom ca. 15 Minuten kontrolliert. Der Patient zeigte im Zusammenhang mit der Injektion einen Anstieg der Herzfrequenz von 94 Schlägen/Minute auf 125 Schläge/Minute. Ebenso verdoppelte sich die Atemfrequenz von 12 auf 24/Minute. Körpertemperatur, Schleimhautfarbe und kapilläre Füllungszeit veränderten sich nicht. Nach ca. 10 Minuten hatten sich alle Werte wieder normalisiert und blieben konstant. Die Aufwachphase war ruhig und ohne weitere Komplikationen. Der Hund wurde am Tag der Injektion entlassen und belastete die Gliedmaße nicht, war relativ ruhig und hochgradig schmerzhaft bei Berührung des linken Ellbogens. Daraufhin erhielt der Hund 10 mg Levomethadonhydrochlorid (L-Polamivet®, Intervet) subcutan.

Einen Tag später zeigte das Tier unkontrolliertes Laufen auf drei Beinen, Kopfschütteln, lecken am ganzen Körper und deutliche Schmerzäußerungen. Futter und Wasseraufnahme waren reduziert. Harn- und Kotabsatz waren normal. Bei der klinischen Untersuchung war eine mittelgradige Lahmheit vorn links, eine deutliche Rötung der Haut über der Injektionsstelle und starke Schmerzhaftigkeit bei Palpation des Ellbogens zu erkennen. Das Tier erhielt 150 mg Carprofen (Rimadyl®, Pfizer) und 10 mg Levomethadonhydrochlorid (L-Polamivet®, Intervet) subcutan, woraufhin sich die klinischen Symptome sofort besserten.

Eine erneute Vorstellung des Patienten erfolgte nach 11 Tagen, bei der sich die Lahmheit unverändert zeigte. Weitere klinischen Symptome waren nicht sichtbar. Mit dem Besitzer wurde das weitere Vorgehen besprochen. Weitere Kontrollen nach der Capsaicin- Injektion erfolgten nicht, da die Besitzer nicht mehr in der Klinik vorstellig wurden.

b) Röntgen- Befunde

Die Röntgenaufnahmen des linken Ellbogens vor der Capsaicin- Injektion zeigten eine hochgradige Arthrose mit Verdacht auf FCP (Abb. 21).

Auf den Röntgenbildern 11 Tage nach der Injektion konnte keine Veränderung im Vergleich mit den ersten Aufnahmen festgestellt werden (Abb. 22).



**Abb. 21: Linker Ellbogen vor der Behandlung
Hochgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**



**Abb. 22: Linker Ellbogen nach der Behandlung
Hochgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

c) Beurteilung durch den Besitzer

Vor der Behandlung schätzte der Besitzer das Allgemeinbefinden und die Stimmung seines Hundes als relativ schlecht ein, die tägliche Bewegung hatte deutlich abgenommen. Der Hund zeigte morgens deutlich einen steifen Gang, eine persistierende Lahmheit, jedoch keine Schmerzäußerungen.

Einen Tag nach der Behandlung berichtete der Besitzer von sehr starken Schmerzäußerungen bei leichter Berührung des Ellbogengelenks und einem sehr schlechten Allgemeinbefinden. Dieser Zustand besserte sich wieder nach erneuter Schmerzmittelgabe, wurde jedoch nicht besser als vor der Injektion von Capsaicin.

Hund II:

a) Verlauf nach der Behandlung

Während und ca. 20 Minuten nach der Injektion von Capsaicin wurden die Kreislaufparameter des Hundes kontrolliert und keine klinischen Nebenwirkungen festgestellt.

Nach der Behandlung wurde der Hund erst nach fünf Wochen wieder zur Kontrolle vorgestellt. Der Patient zeigte immer noch deutliches Übergewicht und eine gering- bis mittelgradige Lahmheit vorn links.

Die letzte Kontrolle erfolgte drei Wochen später, bei der keine Veränderung zur ersten Nachuntersuchung feststellbar war. Daraufhin wurde das weitere Vorgehen besprochen.

b) Röntgen- Befunde

Bei der Erstvorstellung zeigten die Röntgenbilder des linken Ellbogengelenks eine hochgradige Arthrose, eine unscharfe Kontur des medialen Proc. coronoideus, mittel- bis hochgradige osteophytäre Zubildungen auf dem Proc. anconaeus, dem Radiuskopf und dem Condylus humeri und eine vermehrte Sklerose im Bereich der Incisura ulnaris. Ein FCP war nicht auszuschließen (Abb. 23).

Die Röntgen Aufnahmen fünf Wochen nach der Behandlung zeigten keine Veränderung zur Voruntersuchung (Abb. 24).



**Abb. 23: Linker Ellbogen vor der Behandlung
Hochgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**



**Abb. 24: Linker Ellbogen nach der Behandlung
Hochgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

c) Beurteilung durch den Besitzer

Vor der Behandlung berichtete der Besitzer von einem guten Allgemeinbefinden und einer guten Stimmung des Hundes, jedoch deutlich steifem Gang, einer persistierenden Lahmheit vorn links und ab und zu auch Schmerzüßerungen. Die tägliche Aktivität hatte deutlich abgenommen.

Bei der Wiedervorstellung fünf Wochen später hatte sich die tägliche Aktivität etwas erhöht, jedoch bestand weiterhin ein steifer Gang und eine persistierende Lahmheit. Schmerzüßerungen wurden nicht beobachtet. Insgesamt wurde keine Verbesserung durch die Capsaicin- Injektion erreicht.

4.3. Botox- Injektion

Nach der Behandlung erfolgten klinische Untersuchungen und die Beurteilung durch den Besitzer. Die Einschätzung des Besitzers erfolgte mittels eines Fragebogens, der sowohl vor, als auch nach der Operation mehrmals ausgefüllt wurde, um den klinischen Verlauf zu dokumentieren.

Die Fragen bezogen sich auf das Allgemeinbefinden des Hundes (Stimmung, Zeichen von Wohlbehagen), auf die Veränderungen in der Aktivität des Hundes (selbstständiges Spielen oder bewegen) und auf deutliche Schmerzanzeichen (Schmerzäußerungen, Lahmheiten).

	Hund I	Hund II	Hund III	Hund IV
Betroffenes Gelenk	Linkes Ellbogengelenk	Linkes Ellbogengelenk	Rechtes Ellbogengelenk	Linkes Ellbogengelenk
Menge Botox	50 Einheiten	50 Einheiten	50 Einheiten	100 Einheiten
Nebenwirkungen der Behandlung	keine	keine	keine	keine
Röntgenbefunde	Verdickung am Radius geringgradige Arthrose	geringgradige Arthrose	hochgradige Arthrose Verknöcherung der Weichteile	Osteophyten an Humerus und Radius mittelgradige Arthrose
Bewertung des Erfolges anhand klinisch- orthopädischer Untersuchung	keine Verbesserung	keine Verbesserung	keine Verbesserung	Verschlechterung
Bewertung der Behandlung durch den Besitzer	geringgradige Verbesserung	keine Verbesserung	keine Verbesserung	keine Verbesserung

Tab. 8: Befunde nach der Botox- Injektion

Hund I:

a) Verlauf nach der Behandlung/ klinische Untersuchungen

Nebenwirkungen der Botox- Injektion konnten bei diesem Hund nicht festgestellt werden.

Eine Wiedervorstellung erfolgte vier Wochen später, bei der sich die Lahmheit klinisch unverändert darstellte. Eine letzte Kontrolle erfolgte erst weitere sechs Monate später, bei der auch keine Verbesserung erkennbar war. Weitere Behandlungen erfolgten beim Haustierarzt.

b) Röntgen- Befunde

Die Röntgenaufnahmen vor der Behandlung zeigten wulstartige Verdickungen kranial am Radius der linken Vordergliedmaße. Es konnte eine geringgradige Arthrose festgestellt werden (Abb. 25). Weitere Röntgenbilder wurden nicht angefertigt.



**Abb. 25: Linkes Ellbogengelenk vor der Behandlung
Geringgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

c) Beurteilung durch den Besitzer

Am Tag der Behandlung beschrieb der Besitzer das Allgemeinbefinden und die Stimmung des Hundes als mäßig gut. Die tägliche Aktivität hatte deutlich abgenommen und der Patient zeigte deutlich einen steifen Gang sowohl morgens als auch nach Belastung und eine persistierende Lahmheit auf der linken Vordergliedmaße. Ab und zu beobachtete der Besitzer auch Schmerzüßerungen bei bestimmten Bewegungen.

Eine Woche nach der Botox- Behandlung hatte sich das Allgemeinbefinden etwas gebessert, der steife Gang und die Lahmheit waren unverändert. Schmerzüßerungen wurden selten bemerkt. Die ersten zwei Tage nach der Injektion wurde die Pfote nicht belastet, dies besserte sich jedoch ohne Behandlung.

Vier Wochen post OP berichtete der Besitzer, dass der Hund wieder mehr spielte und die tägliche Aktivität zugenommen hatte. Die Lahmheit war jedoch immer noch diagnostizierbar.

Zwei Wochen später berichtete der Besitzer von einer Besserung. Der Hund lief leichter und flüssiger. Das Bein wurde trotzdem noch oft entlastet und die Lahmheit verschlimmerte sich meist nach Belastung wieder.

Hund II:

a) Verlauf nach der Behandlung/ klinische Untersuchungen

Nebenwirkungen der Botox- Injektion konnten bei dem Patienten nicht festgestellt werden.

12 Tage nach der Behandlung zeigten sich keine Veränderungen der Lahmheit. Eine weitere Kontrolle erfolgte fünf Wochen nach der Injektion. Die Lahmheit war unverändert und der Patient zeigte besonders bei der Streckung des Gelenkes eine deutliche Schmerzreaktion.

b) Röntgen- Befunde

Die Röntgenaufnahmen der linken Vordergliedmaße zeigten vor der Operation geringgradige arthrotische Veränderungen und dackeltypische Fehlstellungen, wie einen gebogenen Radius (*Radius curvus*) (Abb. 26). Weitere Röntgenbilder nach der Behandlung wurden nicht angefertigt.



**Abb. 26: Linkes Ellbogengelenk vor der Behandlung
Geringgradige arthrotische Veränderungen
und dackeltypische Fehlstellung
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

c) Beurteilung durch den Besitzer

Vor der Botox- Injektion zeigte der Hund ein schlechtes Allgemeinbefinden und Gewichtsverlust. Die tägliche Aktivität des Patienten hatte deutlich abgenommen. Der Besitzer berichtete über einen deutlich steifen Gang am Morgen und eine persistierende Lahmheit ohne Schmerzäußerungen.

Eine Woche nach der OP war das Allgemeinbefinden noch immer reduziert und der Patient zeigte keine Anzeichen von Wohlbehagen. Trotz kurzer Belastung pro Tag zeigte der Hund einen steifen Gang, eine persistierende Lahmheit und deutliche Schmerzäußerungen. Insgesamt wurde die Botox- Behandlung als nicht erfolgreich bewertet.

Hund III:

a) Verlauf nach der Behandlung/ klinische Untersuchungen

Drei Wochen nach der Botox- Injektion erfolgte eine Kontroll-Untersuchung in der Klinik. Dabei konnte keine Verbesserung der Lahmheit festgestellt werden. Weitere Untersuchungen und Behandlungen erfolgten beim Haustierarzt.

b) Röntgen- Befunde

Die Röntgenaufnahmen der rechten Vordergliedmaße am Tag der Behandlung zeigten hochgradige osteophytäre Zubildungen im gesamten Gelenk, was zur Diagnose einer hochgradigen sekundären Arthrose mit Mineralisation und Verknöcherung der Weichteile medial sowie lateral führte (Abb. 27 und 28).

Aufgrund nicht zu erwartender Veränderungen im Gelenkbereich wurden nach der Botox- Behandlung keine weiteren Röntgenaufnahmen angefertigt.



**Abb. 27: Rechtes Ellbogengelenk vor der Behandlung
Latero-laterale Aufnahme
Hochgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**



**Abb. 28: Rechtes Ellbogengelenk vor der Behandlung
Aufnahme: anterior- posterior
Hochgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

c) Beurteilung durch den Besitzer

Am Tag der Injektion war das Allgemeinbefinden des Hundes mäßig gut, die tägliche Aktivität hatte sich nicht wesentlich geändert und der Patient zeigte sehr deutlich einen steifen Gang morgens und nach Belastung und eine persistierende Lahmheit vorn rechts. Schmerzüßerungen konnten vom Besitzer nicht festgestellt werden.

Eine Woche nach der Behandlung hatte sich das Allgemeinbefinden etwas verschlechtert und die Lahmheit war unverändert.

Zwei Wochen nach der Therapie war das Allgemeinbefinden etwas besser, jedoch die Lahmheit immer noch sehr stark ausgeprägt. Insgesamt war die Botox- Behandlung nicht erfolgreich.

Hund IV:

a) Verlauf nach der Behandlung/ klinische Untersuchungen

Nebenwirkungen der Injektion konnten nicht festgestellt werden.

Die klinische Untersuchung sechs Wochen nach der Behandlung ergab eine deutliche Verschlechterung der Lahmheit und eine Entlastung der Pfote im Stand und im Sitzen. Zudem war der Ellbogen kaudal-lateral

umfangsvermehrt und eine Krepitation und starke Schmerzhaftigkeit bei Beugung und Streckung des Gelenks erkennbar.

b) Röntgen- Befunde

Die Röntgenbilder des linken Ellbogengelenks vor der Therapie zeigten eine mittelgradige Arthrose, Auflagerungen dorsal am Proc. anconaeus, osteophytische Zubildungen am distalen Humerus und am Radiuskopf und eine vermehrte Sklerose der proximalen Ulna (Abb. 29 und 30). Da durch die Botox-Behandlung keine Veränderungen im Knochen- und Gelenkbereich zu erwarten waren, wurden keine weiteren Röntgenbilder nach der Behandlung angefertigt.



**Abb. 29: Linkes Ellbogengelenk vor der Behandlung
Latero-laterale Aufnahme
Mittelgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**



**Abb. 30: Linkes Ellbogengelenk vor der Behandlung
Aufnahme: anterior- posterior
Mittelgradige Arthrose
(Klinik für Kleintiere, Universität Leipzig)**

c) Beurteilung durch den Besitzer

Vor der Behandlung bewertete der Besitzer das Allgemeinbefinden und die Stimmung seines Hundes als sehr positiv. Die tägliche Aktivität des Hundes hatte sich jedoch in der letzten Zeit deutlich reduziert. Der Patient zeigte morgens nach langem Liegen einen deutlich steifen Gang, eine persistierende Lahmheit, jedoch keine Schmerzáußerungen.

Eine Woche nach der Botox- Injektion wurde das Allgemeinbefinden immer noch als sehr gut bewertet, die tägliche Aktivität hatte ein wenig zugenommen. Obwohl sich der deutlich steife Gang am Morgen ein wenig gebessert hatte, zeigte der Patient weiterhin eine persistierende Lahmheit.

Die Bewertung des Besitzers anhand des Fragebogens änderte sich in den nächsten Wochen nach der Behandlung nicht mehr.

Bei einer weiteren Kontrolle, zwei Wochen später, berichtete der Besitzer von einer Verschlechterung der Lahmheit.

Insgesamt wurde die Botox Behandlung als nicht erfolgreich bewertet.

5 Diskussion

Die OA ist eine der wichtigsten Gelenkerkrankungen des Hundes. Hunde haben ein ausgeprägtes Sozialverhalten und einen großen Bewegungsbedarf. Die Ausbildung einer OA schränkt diese arttypischen Verhaltensweisen deutlich ein. Die Lebensqualität des Tieres nimmt stark ab. Daher ist es um so wichtiger, geeignete Therapiemöglichkeiten der OA zu finden.

Für das Ellbogengelenk ist noch keine erfolgreiche Behandlungsmethode bekannt. Die OA ist nicht heilbar (SANDERSON et al. 2009). Deshalb ist ein gutes Schmerzmanagement ohne erhebliche Nebenwirkungen das angestrebte Ziel der Therapie. Durch die größtenteils erblich bedingte ED entwickelt sich immer häufiger auch bei jungen Hunden eine deutliche OA. Gerade bei diesen Patienten ist aufgrund des Alters eine erfolgreiche, langfristige Therapie von großer Bedeutung.

Derzeit werden zur Therapie der OA im Ellbogengelenk vor allem NSAIDs eingesetzt, die allerdings oft mit sehr starken Nebenwirkungen verbunden sind. Weitere Therapiemöglichkeiten sind der Einsatz von Nutrazeutikals, die Physiotherapie und eine Gewichtsreduktion. Diese Maßnahmen sind durchaus als unterstützende Maßnahmen zur Behandlung der OA geeignet, allerdings wird mit Ihnen keine gute Schmerzreduktion erzielt. Intraartikulär applizierte HS soll die Gleitfähigkeit der Gelenkflächen verbessern und damit die Regeneration der geschädigten Knorpeloberfläche unterstützen (AUER et al. 1980; YARBROUGH 2003). Durch die Gefahr einer septischen Arthritis geht man derzeit bei dieser Therapie allerdings von einem negativen Nutzen-Risiko-Verhältnis aus (UNGEMACH 2003). Endoprothesen im Ellbogengelenk sind möglich, werden allerdings aufgrund der oft schweren Komplikationen nur sehr selten angewendet (DÉJARDIN 2009). Im Bereich des Hüftgelenks ist die chirurgische Denervation als Therapiemöglichkeit gut etabliert. Dabei werden die beteiligten sensiblen Nerven durch Schädigung des Periosts zerstört (KINZEL et al. 2008). Auch nach Denervation des Ellbogengelenks kann mit großer Wahrscheinlichkeit bei klinisch erkrankten Hunden eine Verbesserung der Gliedmaßenfunktion erzielt werden. Diese Theorie stützt sich auf Ergebnisse nach einer diagnostischen Anästhesie mit Xylocain, bei der es bei 83% der behandelten Tiere zu einer Verbesserung der Lahmheit kam (BUDER 2005). Bedingt durch die komplexen anatomischen Strukturen des Ellbogengelenkes und infolge der Tatsache, dass ein erheblicher Anteil der sensiblen Nervenfasern, die das Gelenk innervieren aus dessen Umgebung stammt (STASZYK und GASSE 1999) ist es sehr schwierig, die sensible Innervation des Ellbogengelenkes mit einem vertretbaren Maß an operativen Schäden gezielt zu zerstören.

Hauptziel meiner Dissertation war es, ausgewählte Spinalganglien nach intraartikulärer Applikation eines Neurotoxins und des Fluoreszenzfarbstoffes FG beim gesunden Hund histologisch zu untersuchen. In einem Tierversuch wurde erstmalig an drei Hunden der Rasse „Beagle“ nach einer intraartikulären Injektion mit dem Ribosomen-inaktivierenden Protein OX7-Saporin getestet, ob eine chemische Denervation nach retrogradem Transport des Neurotoxins aus dem Ellbogengelenk in Perikarya der Spinalganglienzellen erfolgt, und ob diese Spinalganglienzellen selektiv durch das Zellgift zerstört werden.

Ein weiterer klinischer Ansatz war es, nach intraartikulärer Applikation ausgewählter Substanzen deren Einsatz zur unterstützenden Therapie beim erkrankten Hund zu untersuchen. An OA erkrankte Patienten der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig wurden im Rahmen eines Therapieversuches mit einer

intraartikulären Injektion von Capsaicin behandelt. Diese Applikation sollte zu einer reversiblen Betäubung des Gelenkes führen.

Das Medikament „Botox“ wurde ebenfalls bei klinisch an OA erkrankten Hunden intraartikulär im Rahmen eines Therapieversuches appliziert, um eine reversible Denervation des Ellbogengelenkes und damit auch eine Schmerztherapie zu erreichen.

In der Humanmedizin wurden beide Präparate erfolgreich in klinischen Studien getestet (SINGH et al. 2010; CANTILLON et al. 2005).

5.1 OX7-Saporin Injektion

5.1.1 Sensible Innervation des Ellbogengelenks beim Hund und Bestimmung der Gesamtanzahl der Neurone in den Ganglien C4 bis Th3

Beim Beagle sollte experimentell nachgewiesen werden, welche Spinalganglien an der Innervation des Ellbogengelenks beim Hund beteiligt sind. Daher wurde in das rechte Ellbogengelenk der Hunde FG als Tracer injiziert. Dieser Fluoreszenzfarbstoff sollte retrograd zum Zellkörper in den entsprechenden Spinalganglien transportiert werden und die an der sensiblen Innervation des Ellbogengelenkes beteiligten Neurone markieren. Eine Bestimmung der beteiligten Ganglien war jedoch leider durch ein technisches Problem mit dem Tracer nicht möglich.

Eine Bestimmung der Gesamtneuronenzahl in diesen Spinalganglien war möglich.

Für die Auswertung der Ganglien C7 und C8 wurden zunächst die für Paraffinschnitte übliche Schnittdicke von 7 µm gewählt. Es stellte sich allerdings heraus, dass diese Dicke für unsere Analyse nicht geeignet war. Um die Auswertung realistisch und objektiv zu gestalten, wurde dann eine Schnittdicke für die Präparate von 20 µm gewählt. Jeder dritte Schnitt wurde zur quantitativen Analyse herangezogen. Diese Vorgehensweise basiert auf vorhergehenden Messungen der Neuronengröße in den Spinalganglien. Bei zu dünnen Paraffinschnitten ist die Gefahr sehr groß, kleine Neurone mehrmals bei der Zählung zu erfassen. Die größten Neurone in den ausgewerteten Ganglien hatten einen Durchmesser von 60 bis 100 µm. Die Wahl des optimalen Abstandes zwischen den Serienschnitten war für die Bestimmung der Gesamtneuronenzahl in einem Ganglion relevant, um die Daten objektiv zu erfassen. Kleine Neurone mit geringerem Durchmesser können bei der Festlegung größerer Abstände zwischen den Serienschnitten nicht erfasst werden. Die gewählte Schnittdicke von 20 µm und die Quantifizierung der Neurone in jedem dritten eingescannten Paraffinschnitt ist ein guter Kompromiss, um mit einem vertretbaren Maß an Arbeitsaufwand eine objektive Erfassung der Gesamtneuronenzahl zu erzielen. Die ermittelte Gesamtanzahl der Nervenzellen pro Spinalganglion ist in Tabelle 4 dargestellt.

Das Ganglion Th1 ist mit einer Anzahl von über 10.000 Nervenzellen das größte ausgewertete Spinalganglion. Die Anzahl der Neurone der Ganglien Th1 links und rechts war bei Hund II mit 6.881 und 6.192 Zellen deutlich geringer als bei den Hunden I und III. Allerdings war die Auswertung dieser Ganglien, durch komprimierte Ränder teilweise stark erschwert.

Die Gesamtneuronenzahl in den zervicalen Ganglien bei Ratten wurde von MILLE-HAMARD et al. (1999) ermittelt, welche für C4, C5 und C6 zwischen 6.000 und 7.800 Neuronen lag. Somit sind meine ermittelten Daten ähnlich den bisher bei Ratten publizierten Befunden.

In lumbalen Spinalganglien wurde die Gesamtneuronenzahl bei Mäusen und Ratten ermittelt. SHI et al. (2001) fanden ca. 12.000 Neuronen in L5 bei Mäusen. SCHMALBRUCH (1987) quantifizierten bei Ratten in L4 12.000, in L5 15.000 und in L6 14.000 Nervenzellen. Ob die Anzahl der Neurone sich mit zunehmendem Alter ändert, wird kontrovers diskutiert. Eine leichte Reduktion (12%) der Gesamtneuronenanzahl in zervicalen und lumbalen Spinalganglien mit zunehmendem Alter wird bei Ratten beschrieben (BERGMAN et al. 1998). POVER et al. (1994) berichteten von einer konstanten Neuronenanzahl bei Ratten, die sich weder mit zunehmendem Alter, noch bei unterschiedlichem Gewicht der Tiere ändert. Leider sind bisher keine Daten über die Gesamtzahl der Nervenzellen in Spinalganglien bei jungen Hunden, ein bis drei Jahre alt, publiziert, so dass kein Vergleich zu den Daten unserer acht bis zehnjährigen Hunde möglich ist.

5.1.2 Kritik des experimentellen Versuchsansatzes

Die Bestimmung der Gesamtanzahl der Neuronen in den ausgewählten Spinalganglien war mit unserem Imaging-Analyse-System und den gewählten Parametern der Paraffinschnitte erfolgreich. Eine Quantifizierung der mit FG markierten Nervenzellen sowohl der linken, als auch der rechten Seite und die Analyse der Neuronen, die nach intraartikulärer Applikation von OX7-Saporin in das Ellbogengelenk zerstört werden sollten war jedoch leider nicht möglich.

Die Ursachen für die fehlende bzw. außerordentlich geringe retrograde Markierung von Neuronen in allen untersuchten Spinalganglien der drei Beagle muss im experimentellen Versuchsdesign liegen. Eine Wirkung des Neurotoxins auf die Neuronen der linken Spinalganglien konnte leider auch nicht dokumentiert werden. Diese zwei intraartikulären Applikationen in das Ellbogengelenk wurden erstmalig bei Hunden durchgeführt.

5.1.2.1 Quantitative Analyse der Präparate mit dem „Improvision- Imaging- System“

Die 20 µm starken Paraffinschnitte wurden mit Hilfe des „Improvision- Imaging- Systems“, bestehend aus dem ZEISS Axioplan 2 und der Software „Openlab 5.5.0“ der Firma PerkinElmer ausgewertet. Zur Analyse der FG-Markierungen verwendeten wir einen Spezialfilter für FG (Transmission 519-700 nm), der für die Quantifizierung der Fluoreszenzmarkierung extra beschafft worden ist. Mit dem Computerprogramm „Openlab“ wurde eine bestimmte Fläche definiert, welche dann mit dem Imaging-System gescannt und gespeichert wurde. Das Programm „AutoPanoPro“ setzte die Einzelbilder nach genauer Berechnung wieder zusammen, so dass aus vielen Bildern ein exaktes Bild des ganzen Paraffin-Schnittes entstand. Das System verfügt über eine sehr leistungsstarke digitale Kamera und die Möglichkeit der Feineinstellungen vieler Parameter, so dass eine hervorragende Bildqualität erzielt und die Neuronen mit dem System objektiv erfasst werden konnten. Diese Bilder wurden dann mit dem Programm „Volocity“ geöffnet. Die Zählung der

vorhandenen Nervenzellen erfolgte, indem jedes Neuron mit einem „x“ gekennzeichnet wurde und das Programm die Anzahl dieser Kennzeichnungen automatisch zählte. Durch diese objektive Methodik konnte sicher gestellt werden, dass jede Nervenzelle im Schnitt bei der Auswertung erfasst wurde. Das Imaging-System und die dazugehörigen Programme erlaubten eine repräsentative und objektive Analyse der Gesamtneuronenanzahl pro Ganglion.

5.1.2.2 Markierung von Gelenkafferenzen mittels Fluoro-Gold

Der Fluoreszenzfarbstoff FG ist ein in der Neuroanatomie häufig genutzter neuronaler retrograder Tracer (WESSENDORF 1991). FG-Markierungen zeichnen sich durch eine intensive, goldgelbe Farbe aus, die vor allem im Zytoplasma der Zellen als feine granuläre Markierung sichtbar ist (SCHMUED und FALLON 1986). Die Aufnahme von FG wird durch aktive Endozytose in pinozytische Vesikel vollzogen (SCHMUED und FALLON 1986). Danach wird der Tracer retrograd zum Zellkörper hin transportiert. FG kann mit 365 nm gut angeregt werden und hat einen Emissionswert zwischen 410 nm und 565 nm.

Bei der Analyse von FG-Markierungen ist zu beachten, dass es im Zytoplasma von Neuronen zu einer Autofluoreszenz, hervorgerufen durch das Pigment Lipofuszin kommen kann. Dieses Pigment, welches sich bei allen Säugetieren mit zunehmendem Alter im Zytoplasma von Nervenzellen anreichert, besitzt ein ähnliches spektrales Verhalten wie FG (Lipofuszin: Emission: 430 nm; FG: Emission 410-565 nm) (GARRETT et al. 1991; SIMS und GILMORE 1994; TSAI et al. 2001). Um die Verwechslung einer FG-Markierung mit einer derartigen Autofluoreszenz auszuschließen, verwendeten wir für unsere Analyse einen Spezialfilter für FG, der eine Transmission zwischen 520 und 700 nm besitzt und damit eine FG-Markierung spezifisch erkennen kann. Bedingt durch das fortgeschrittene Alter der Beagle (acht bis zehn Jahre) war im Zytoplasma der Nervenzellen aller Ganglien sehr viel Autofluoreszenz vorhanden, so dass eine Unterscheidung von einer FG-Markierung nicht möglich war. Der Spezialfiltersatz für die selektive Detektion von FG konnte nicht zweifelsfrei zwischen der Autofluoreszenz und einer retrograden FG-Markierung unterscheiden. Deshalb wurden Spinalganglien von zwei weiteren Hunden auf intrazytoplasmatische Autofluoreszenz in den Neuronen, als Kontrolle zur Unterscheidung von einer retrograden FG-Markierung untersucht. In den Spinalganglien eines 8 Monate alten Beagle, der aus einem anderen Tierversuch stammte, konnte kein Lipofuszin mit dem Spezialfilter für FG detektiert werden. In den Spinalganglien eines 15 Jahre alten Schäferhundes wurden sehr starke Einlagerungen dieses Pigmentes nachgewiesen. Dieses Kontrolltier hatte keine intraartikuläre FG-Applikation erhalten.

Nach dieser Kontrolle wurden alle nicht eingedeckten Paraffinschnitte mit Sudan-Schwarz gefärbt. Dieser Fettfarbstoff besitzt konzentrationsabhängig die Fähigkeit, die Lipofuszin Autofluoreszenz zu eliminieren. Diese Schnitte wurden dann auch mit dem Improvisation-Imaging-Systems gescannt und auf retrograde FG-Markierung analysiert. Leider war fast keine FG-Markierung in den Neuronen nachweisbar. In den Ganglien C6 und Th1 fanden wir sehr wenige Nervenzellen, die retrograd mit FG markiert waren. Eine Beteiligung der Ganglien C6 und Th1 an der sensiblen Innervation des Ellbogengelenks ist ein weiterer experimenteller Beleg für die Relevanz der von STASZYK und GASSE (1999) publizierten Befunde zur Innervation des

Ellbogens. Die Spinalnerven des Plexus brachialis: *N. radialis*, *N. musculocutaneus*, *N. medianus* und *N. ulnaris* entlassen Gelenkkapseläste, die sich unterschiedlich innerhalb der Kapsel verzweigen (STASZYK und GASSE 1999). Die Ursprungsgebiete dieser Nerven liegen für den *N. radialis* in den Segmenten C7 bis Th2, für den *N. musculocutaneus* in den Segmenten C6 bis C8, für den *N. medianus* in den Segmenten C8 und Th2 und für den *N. ulnaris* in den Segmenten C8 bis Th2 (SALOMON et al. 2008). Eine retrograde FG-Markierung der Neuronen in den Ganglien C7 und C8 wurde nach intraartikulärer Applikation des Tracers erwartet. Die Anzahl der klar detektierten FG-Markierungen war jedoch mit jeweils 2 bis 10 Nervenzellen pro Ganglion außerordentlich gering.

SALO et al. (1997) fanden in lumbalen Spinalganglien von Ratten zwischen 500 und 600 mit FG markierte Neuronen. Bei Katzen lag die Zahl der retrograd mit Fast Blue markierten Neuronen in den lumbalen Spinalganglien zwischen 700 und 850 Nervenzellen (HANESCH et al. 1995). Für die außerordentlich geringe bzw. nicht nachweisbare retrograde Markierung der Nervenzellen in den an der Innervation des Ellbogengelenks der Beagle beteiligten Spinalganglien können folgende Ursachen postuliert werden:

1. Überlebenszeit

SALO et al. (1997) fanden sieben Tage nach FG-Applikation in das Kniegelenk von Ratten zahlreiche retrograd markierten Neuronen in den entsprechenden Spinalganglien. Bei Ratten wird das FG innerhalb von sieben Tagen retrograd bis zum Perikaryon in den Spinalganglien transportiert.

Wir haben erstmalig bei Hunden FG intraartikulär in das Ellbogengelenk appliziert. Die Beagle wurden nach einer Überlebenszeit von drei Wochen getötet. Diese Zeitspanne wurde aufgrund der Länge der das Ellbogengelenk innervierenden Nerven ausgewählt. Pro Zentimeter, den das FG retrograd transportiert werden muss, wurde ein Tag Wartezeit berechnet. Diese Vorgehensweise basiert auf einer persönlichen Mitteilung per Email des Herstellers des Tracers (Daniel C. Himelsbach, Denver CO, 21.08.2008). Die Länge der Nerven wurde durch Messung des Abstandes zwischen Ellbogengelenk und den entsprechenden Spinalganglien der Wirbelsäule ermittelt. Dieser Abstand betrug bei allen Tieren zwischen 14 cm und 17 cm, so dass sich eine Überlebenszeit von 14 bis 17 Tagen ergab. Alle Tiere wurden 21 Tage nach der FG-Applikation euthanasiert. Eine längere Überlebenszeit der Tiere beeinflusst die Fluoreszenz-Markierung nicht negativ, da das im Zytoplasma der Nervenzellen lokalisierte FG nicht austreten kann (SCHMUED und FALLON 1986). Eine zu geringe Überlebenszeit kann eine fehlende Markierung der Perikarya zur Folge haben. Wir gehen jedoch davon aus, dass eine Überlebenszeit von drei Wochen für den Transport des Tracers ausreichend war, was in einer persönlichen Mitteilung des Herstellers ebenfalls bestätigt wurde (Daniel C. Himelsbach, Denver CO, 16.08.2011).

2. Konzentration und Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes in das Ellbogengelenk

Innerhalb der Gelenkkapsel wurden zahlreiche FG-Granula nachgewiesen. Dieser Nachweis ist der Beweis dafür, dass sich der Fluoreszenzfarbstoff definitiv im Gelenk verteilt hat und nicht nach der Injektion wieder ausgetreten ist.

Die wahrscheinlichste Ursache für das Fehlen markierter Neuronen in den entsprechenden Spinalganglien ist eine zu niedrige Konzentration von FG in der Applikationslösung. SALO et al. (1997) applizierten 5 µl 2%iges FG, gelöst in destilliertem Wasser, in das Kniegelenk der Ratte. Sieben Tage später wurden die Ratten getötet und die Spinalganglien ausgewertet (SALO et al. 1997). HANESCH et al. (1995) führten ebenfalls Versuche an Ratten durch. Sie injizierten 4%iges FG, gelöst in einem Volumen von 15 µl in Ethylenglykol bzw. in sterilem Wasser. Bei gleichartigen Injektionen mit dem Farbstoff Fast Blue in das Kniegelenk von Katzen wurde entweder die Konzentration auf 6,6% oder das Volumen auf 25 µl erhöht. In beiden Fällen wurde somit eine Menge von 1 mg des Fluorophores in das Gelenk eingebracht (HANESCH et al. 1995). FG und Fast Blue können in etwa in einem gleichen Volumen und in gleicher Konzentration eingesetzt werden (persönliche Mitteilung per Email, Ulrike Hanesch, Luxembourg, 26.02.2007). Eine Markierung von artikulären Kniegelenksafferenzen beim Hund (Welpen, ca. 3kg Körpergewicht) konnte nach Applikation von 1mg Fast Blue, gelöst in 25 µl Ethylenglykol nachgewiesen werden (TAMURA et al. 1998).

Beim Hund (Mischlinge) wurde die Innervation des *Musculus gastrocnemius* von MARSALA et al. (2005) nach FG- Injektionen in diesen Muskel nachgewiesen. Sie injizierten 25 – 30 µl 4%iges FG und konnten gute FG- Markierungen in den Spinalganglien L7 und S1 darstellen. WANG et al. (2005) injizierten 50 µl einer 5%igen FG- Lösung in den N. ischiadicus von drei Hunden der Rasse "Beagle", um die Regeneration dieses Nerven nach operativer Durchtrennung zu untersuchen. Ein experimenteller Ansatz, eine FG- Applikation in das Ellbogengelenk beim Hund, wurde bisher noch nicht publiziert.

In den Versuchen zu meiner Dissertation wurde FG in einer Dosierung von 4,5 mg FG, gelöst in 0,25 ml NaCl- Lösung, injiziert. Die fluoreszenzhistologische Auswertung der Spinalganglien ergab, dass die Konzentration dieser 1,8%igen Lösung eindeutig zu gering war. Eine Anfrage beim Hersteller des Tracers bestätigte diesen wesentlichen Fehler im Versuchsdesign (persönliche Mitteilung Daniel C. Himelsbach, Denver CO, 16.08.2011).

Eine weiterer Grund für die fehlende retrograde Markierung der Neuronen in den Spinalganglien könnte sein, dass sich FG-Agglomerate gebildet haben, die eine Aufnahme des Tracers in die Axone verhinderten.

3. Sudan-Schwarz-Färbung der Spinalganglienschnitte

Die Sudan-Schwarz-Färbung, das „Quentschen“, könnte eine Reduzierung der Intensität der Fluoreszenzmarkierung zur Folge haben. Eine 1%-ige - bis 10%-ige Sudan-Schwarz-Lösung eliminiert die vom Lipofuszin ausgehende Autofluoreszenz komplett, reduziert jedoch in geringem Maße auch die Intensität der FG- Markierungen (SCHNELL et al. 1999).

Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die Sudan-Schwarz-Färbung die FG- Markierungen vollständig überdeckt hat.

5.1.2.3 Denervation des caninen Ellbogengelenks mit OX7-Saporin

Die Verwendung von OX7-Saporin zur chemischen Denervation eines Gelenkes wurde von SALO et al. (1997) bei Ratten erstmalig experimentell durchgeführt. Nach Injektion von OX7-Saporin in das Kniegelenk der Ratte wurden ca. 88% der afferenten Nervenfasern zerstört.

Saporin wird aus der Pflanze *Saponaria officinalis* gewonnen. Es ist ein äußerst toxisches, Ribosomen-inaktivierendes Protein, welches die Ribosomenaktivität und damit die Proteinbiosynthese enzymatisch hemmt (STIRPE 2004). Durch das Fehlen einer B- Kette kann das Toxin nicht ohne Carrier in eine Zelle eindringen (STIRPE et al. 1980). Deshalb wurde Saporin an den monoklonalen Antikörper OX7 gekoppelt, durch den das Toxin in die Zelle eingeschleust wird (RAFF et al. 1979; CRAWFORD und BARTON 1986). Intraartikulär injiziert, wird Saporin retrograd zum Zellkörper in den Spinalganglien transportiert und kann dort seine Wirkung entfalten. Innerhalb der Nervenzelle spaltet es als N- Glykosidase einen essentiellen Adeninrest (Adenin 4324) an der 28 S- Untereinheit der ribosomalen RNA (rRNA) ab und hemmt damit irreversibel die weitere Proteinbiosynthese, wodurch die Zelle zugrunde geht (NIELSEN und BOSTON 2001). Es ist wahrscheinlich, dass nur ein einziges Molekül des Toxins, welches sich frei im Zytosol befindet, ausreicht, um genügend Ribosomen zu inaktivieren und die Zelle zu zerstören (WILEY und KLINE 2000). Das, nach dem Zerfall des Neurons freigewordene Saporin ist dann ohne biologische Aktivität, da es seinen Antikörper eingebüßt hat.

Intraartikulär injiziert schädigt das Toxin die sensible Innervation des Gelenkes. Um die Schädigung der Afferenzen nachzuweisen, wurde FG als Tracer eingesetzt, der von intakten Axonen retrograd zum Zellkörper transportiert wird. Diese FG- Markierungen sollten in den Neuronen der Spinalganglien mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Sind die Nervenfasern durch Saporin jedoch zerstört, können sie den Tracer nicht mehr transportieren und in den entsprechenden Spinalganglien sind keine markierten Neuronen sichtbar.

Bei Ratten wurde das Toxin zur chemischen Denervation des Kniegelenks eingesetzt (SALO et al. 1997). Da Saporin über keine eigene intrinsische Bindungsaktivität verfügt, koppelte er das Toxin an den monoklonalen Antikörper OX7, welcher bei Ratten an das Oberflächenglykoprotein Thy1 binden kann. Thy 1 wird bei Ratten von Nervenzellen und T-Lymphozyten exprimiert (RAFF et al. 1979; CRAWFORD und BARTON 1986). In seinen Versuchen wurde das Toxin in einer Konzentration von 0,32 mg/ ml. in das Kniegelenk injiziert. Das Injektionsvolumen variierte zwischen 1,5 und 15 µl, jeweils aufgefüllt mit Phosphatpuffer auf ein Injektionsvolumen von 20 µl. Sieben Tage später wurden die Ratten getötet und die Spinalganglien entnommen (SALO et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Versuchsansatz für das Ellbogengelenk übernommen und mit geänderten Mengen und Zeiten an drei Beagle- Hündinnen durchgeführt. Es wurden je 100 µg OX7-Saporin, gelöst in 0,5 ml phosphatgepuffertem NaCl, in das linke Ellbogengelenk der Tiere injiziert. Diese Dosis wurde empirisch gewählt, da noch keine Studien einer Applikation von OX7-Saporin beim Hund vorliegen. Um herauszufinden, ob und in welchem Maße OX7-Saporin nach intraartikulärer Injektion die Gelenkafferenzen des Ellbogengelenks zerstört, wurde OX7-Saporin nur in das linke Ellbogengelenk

injiziert, damit das unbehandelte rechte Ellbogengelenk als Kontrolle dienen konnte. Dieser Vergleich wurde mit den Spinalganglien Th1 und Th2 durchgeführt. Im Ganglion Th1 wurde die größte Gesamtneuronenanzahl der untersuchten Spinalganglien ermittelt. Wir haben erwartet, dass in den Spinalganglien der linken Seite die Anzahl der retrograd mit FG markierten Neurone wesentlich geringer sein wird im Vergleich mit den FG-Markierungen der rechten Seite, da die, durch das Toxin zerstörten Nervenfasern der linken Seite kein FG retrograd in die Perikarya der Neurone transportieren können. In den untersuchten Spinalganglien der linken Seite konnte jedoch keine Toxinwirkung nachgewiesen werden. Eine massive Degeneration oder Schädigung der Perikarya in den Spinalganglien beider Seiten wurde nicht dokumentiert. Dieser wichtige Befund lässt darauf schließen, dass auch die Zerstörung der Neurone in den linken Spinalganglien nach intraartikulärer Applikation von OX7-Saporin in das linke Ellbogengelenk nicht erfolgreich war.

Folgende Ursachen werden diskutiert:

1. Konzentration der OX7-Saporin Lösung und Überlebenszeit der Tiere

Die gewählte Konzentration des OX7-Saporins (0,2 mg/ml) war im Vergleich zu den Ratten (0,32 mg/ml) (SALO et al. 1997) geringer. Deshalb kann auch hier eine zu niedrige Konzentration die Ursache für die fehlende Wirkung des Neurotoxins sein.

Damit das Toxin retrograd zum Zellkörper hin transportiert werden kann, wurde eine Wartezeit von 14 Tagen eingehalten. Da bisher kein solcher Versuch an Hunden durchgeführt wurde, musste die Wartezeit empirisch gewählt werden. Im Versuch mit Ratten wurde eine Wartezeit von 7 Tagen gewählt (SALO et al. 1997). Es ist durchaus möglich, dass unsere gewählte Zeit von 14 Tagen nicht ausreichend für den Transport des Toxins war. Das Neurotoxin hat wahrscheinlich die Zellkörper der Neurone in den Spinalganglien nicht erreicht.

2. Antikörperbindung an Thy 1

OX7-Saporin koppelt durch seinen Antikörper an Thy 1. Thy 1 (CD90) ist ein Oberflächenglykoprotein, welches in den 60er Jahren entdeckt wurde. Der Name Thy 1 wurde aufgrund seiner Entdeckung auf Thymozyten gewählt (THYmocyte differentiation antigen 1) (ADES et al. 1980).

In den bisher mit verschiedenen Tierarten publizierten Studien wurde Thy 1 auf Nervenzellen und Fibroblasten gefunden (PONT 1987). Thy 1 wird in der Ratte vor allem von Nervenzellen und T-Lymphozyten exprimiert (MORRIS et al. 1980; MORRIS und RITTER 1980). In der Maus findet man es auch auf Epidermiszellen und Keratinozyten (REIF und ALLEN 1964; PONT 1987).

Für die Planung unseres Versuches, der Injektion von OX7-Saporin in das Ellbogengelenk von Hunden, wurde im Institut für Neuropathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Maximilian Universität München *in vitro* getestet, ob auch beim Hund Thy 1 exprimiert wird. Thy 1 wurde auf Nervenzellen, T-Lymphozyten und Fibroblasten gefunden. Da keine weiteren Daten über Thy 1 beim Hund existieren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Glykoprotein auf Nervenzellen nicht immer vorkommt und auch deshalb das Toxin in der gewählten Konzentration die Neurone in den Spinalganglien nicht erreicht hat.

5.1.3 Klinische Ergebnisse des Versuches

Die Überwachung der Versuchshunde kann in klinische und orthopädische Untersuchungen und die Bestimmung der Laborparameter unterteilt werden. Die histologische Untersuchung der Gelenke ist auch von großer Bedeutung, soll jedoch Gegenstand einer anderen Arbeit sein.

Die Hunde wurden nach den Versuchen streng überwacht, um eventuelle Nebenwirkungen durch das applizierte OX7-Saporin bzw. das FG zu erkennen. Um sicherzustellen, dass die Hunde vor dem Versuchen gesund waren, wurden allen Tiere einer gründlichen Untersuchung unterzogen. Vor den Applikationen konnten bei keinem der Hunde klinische Auffälligkeiten festgestellt werden.

Zur klinische Überwachung wurde in regelmäßigen Abständen ein allgemeiner Untersuchungsgang durchgeführt. Sowohl nach der OX7-Saporin Injektion als auch nach der Applikation von FG konnten keine abnormen klinischen Befunde erhoben werden. In dem von SALO et al. (1997) durchgeführten Versuch an Rattenknien Gelenken wurden ebenfalls keine Verhaltensänderungen oder sonstige klinische Befunde nach Applikation von FG oder Saporin beschrieben.

Das Toxin Saporin verfügt über keine intrinsische Bindungsaktivität (STIRPE 2004) und bindet erst durch seinen Antikörper OX7 an eine Zelle, die das Antigen Thy1 exprimiert, und entfaltet innerhalb der Zelle seine toxische Wirkung (WILEY et al. 1989). Das nach deren Zerfall wieder freigewordene Saporin ist zu diesem Zeitpunkt ohne biologische Aktivität, da es seinen Antikörper eingebüßt hat. Da wahrscheinlich keine anderen Zellen außer Nervenzellen, T-Lymphozyten und Fibroblasten Thy1 auf ihrer Oberfläche tragen (PONT 1987; MORRIS et al. 1980; MORRIS und RITTER 1980), konnte das Saporin an keiner anderen Struktur des Körpers binden und seine Wirkung entfalten.

Orthopädisch zeigten alle Hunde nach der Injektion von OX7-Saporin eine deutliche Lahmheit auf der betroffenen Gliedmaße. Durch die aseptische Vorbereitung der Gelenke vor dem Eingriff und dessen Durchführung in einem sterilen Operationssaal wurde die Infektionsgefahr stark reduziert. Während des Versuches gab es keine Hinweise auf eine bakterielle Infektion. Da unsere Versuchshunde vor dem Experiment keine Lahmheit zeigten, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Injektion von OX7-Saporin für die Symptome verantwortlich. Durch die Injektion eines Neurotoxins in das Gelenk kommt es zu einer Immunreaktion des Körpers. Es entstehen die typischen Anzeichen einer Entzündung: Schmerz, Rötung, Hitze und Schwellung (MURPHY et al. 2009). Es werden Entzündungszellen (Makrophagen) freigesetzt und es kommt zu einer Vergrößerung der Gefäßdurchmesser und zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Gefäße. Zudem werden die Endothelzellen der Blutgefäße aktiviert, Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, welche die Bindung zirkulierender Leukozyten verstärkt (MURPHY et al. 2009). Die Makrophagen sezernieren durch enzymatische Reaktion zusätzlich Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Prostaglandine, Leukotriene und den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) (MURPHY et al. 2009). Nach diesen Substanzen entfalten Cytokine, vor allem Interleukine (IL-1, IL-4, IL-6, IL-8) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (GOLDRING 1999) ihre Wirkung. Durch diese Stoffe werden weitere Entzündungszellen angelockt (MURPHY et al. 2009).

Insbesondere bei Hund II wurde eine vermehrt warme Ellbogenregion und eine Schmerzhaftigkeit bei der Extension des Gelenkes beobachtet. Bei den anderen beiden Tieren war nur die Lahmheit als deutliches Zeichen einer Schmerzhaftigkeit zu erkennen. Durch die Injektion in das Gelenk wird die gut innervierte und durchblutete Gelenkkapsel verletzt. Beschädigte Blutgefäße lösen dann eine weitere Enzymkaskade aus. Das Kininsystem ist eine Kaskade von Plasmaproteinen, die von Gewebeschäden ausgelöst wird und mehrere Entzündungsmediatoren erzeugt, unter anderem das gefäßaktive Peptid Bradykinin. Das Molekül bewirkt eine Zunahme der Gefäßpermeabilität und ist zudem an der Schmerzentstehung beteiligt (MURPHY et al. 2009). Durch diese Schmerzen wird das betroffene Körperteil immobilisiert, was die Ausbreitung der Entzündung begrenzt (MURPHY et al. 2009).

Das Thy1 Oberflächenglykoprotein soll nicht nur von Nervenzellen und T-Lymphozyten, sondern auch von Fibroblasten exprimiert werden (PONT 1987). Das injizierte Toxin, hier OX7-Saporin, kann durchaus an die Fibroblasten der Kapsel binden und diese schädigen. Durch diesen Mechanismus werden die freien Nervenendigungen, welche sich in großer Anzahl in der Gelenkkapsel befinden, gereizt. Die aufgetretene Lahmheit könnte auch durch eine Entzündung oder Schädigung der Gelenkkapsel verursacht worden sein.

Die vorsorgliche Applikation von Schmerzmitteln war in unserem Versuch nicht vorgesehen, da das Auftreten von Schmerzen einen deutlichen Hinweis auf den Grad der Nebenwirkungen gab. Da der Versuch der Vorbereitung auf eine klinische Studie diente, war die Erfassung der Nebenwirkungen eines der Ziele der Arbeit. Nach Feststellung einer mittelgradigen Lahmheit wurden die Hunde mit NSAIDs behandelt, da den Tieren keine unnötigen Schmerzen zugefügt werden sollten.

SALO et al. (1997) beschrieben in ihren Versuch keine Lahmheiten, da die Ratten sich „normal“ in ihrem Käfig bewegten. Da bei diesen Nagern keine orthopädische Untersuchung durchgeführt werden konnte, waren geringgradige Lahmheiten deutlich schwerer zu erkennen als bei einem Hund. Nach einer Behandlungsdauer von fünf Tagen wurde von allen Tieren die Gliedmaße wieder voll belastet und die Applikation von Schmerzmitteln abgebrochen. Auch danach kam es zu keiner erneuten Verschlechterung. Über Langzeitauswirkungen des Toxins kann aufgrund der Tötung der Hunde keine Aussage getroffen werden.

Der vor dem Versuchsbeginn deutlich niedrige Glukosespiegel bei allen Hunden kann verschiedene Ursachen haben. Die Messung dieses Parameters erfolgte erst einige Stunden nach der Blutentnahme. Da die Proben nicht in einem stabilisierten NAF Medium (Natriumfluorid = Glykolysehemmer) transportiert wurden, ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund für die falsch niedrigen Werte (KRAFT et al. 2005). Ein niedriger Harnstoffwert, wie er bei Hund I vor dem Versuch festgestellt wurde, kann durch die zwölfstündige Nahrungskarenz bedingt sein. Eine Erniedrigung dieses Parameters kann beispielsweise auch durch eine Hepatopathie oder Diabetes insipidus ausgelöst werden (KRAFT et al. 2005). Bei diesem Hund wurde auch eine geringgradige Erhöhung der Alanin- Aminotransferase gemessen. Dieses Enzym gilt beim Hund als leberspezifisch (KRAFT et al. 2005). Der gemessene Wert war nur leicht erhöht, kann aber, vor allem im Zusammenhang mit dem niedrigen Harnstoffwert, auf eine vorhandene, leichte Leberschädigung hinweisen. Der Wert war jedoch nur vor dem Versuch erhöht, während der nachfolgenden Kontrollen befand er sich wieder im Referenzbereich. Daher ist eine Verschiebung durch die fehlende Fütterung

wahrscheinlich. Ein Anstieg der Gesamtleukozytenzahl kann durch körperfremde Proteine ausgelöst werden (KRAFT et al. 2005) und deutet auf eine Entzündungsreaktion hin. Sowohl die Lahmheit bei allen Hunden als auch die Schmerzhaftigkeit und die Wärme im Ellbogengelenk bei Hund II bestätigen diese Vermutung. Eine solche Reaktion kann ebenfalls durch die Verletzung der Kapsel bei der Injektion hervorgerufen werden.

Nach der Saporininjektion war bei allen Hunden eine mittelgradige Lahmheit zu erkennen, welche mit NSAIDs behandelt wurden. Durch die Gabe dieser Medikamente kam es zum einen zu einer deutlichen Schmerzreduktion, zum anderen zu der Hemmung einer vorliegenden Entzündung.

Zwei Wochen nach der Injektion von OX7-Saporin wurde erneut eine intraartikuläre Injektion vorgenommen, um den Farbstoff FG zu applizieren. Nach dieser Injektion konnten wiederum außer einer leichten Leukozytose, keine Abweichungen im Bereich der Blutparameter festgestellt werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls als Reaktion auf einen körperfremden Stoff und die erneute Verletzung der Kapsel zu bewerten ist.

5.1.4 Schlussfolgerung

Aufgrund der zu niedrigen Konzentration der applizierten FG-Lösung in das Ellbogengelenk und der wirkungslosen OX7-Saporin Applikation in das linke Ellbogengelenk kann keine Aussage zur Therapie der OA durch chemische Denervation des Gelenks beim Hund durch das Neurotoxin gemacht werden.

Vor weiterführenden Untersuchungen müssen folgende Punkte berücksichtigt werden:

- a) In Vorversuchen muss die optimale Konzentration des Tracers FG ermittelt werden oder alternativ ein anderer Tracer zur retrograden Markierung der Neurone appliziert werden.
- b) In Vorversuchen ist zu klären, ob und an welchen Zellen ein Thy1 Rezeptor beim Hund lokalisiert ist.
- c) Für OX7-Saporin muss die optimale Konzentration und Wartezeit in einem Vorversuch ermittelt werden.

5.2 Capsaicin- Injektion

Capsaicin ist ein Vanilloid-Rezeptor-Agonist (auch TRPV1-Rezeptor genannt). Über diesen Rezeptor werden sensible Nervenfasern aktiviert, die einen intensiv brennenden Schmerz vermitteln (MARSH et al. 1987). Nach einer Reizung bewirkt Capsaicin eine Desensibilisierung gegenüber nozizeptiven Reizen (FITZGERALD und WOOLF 1982). Dieser spezifische Mechanismus führt zu einer Blockierung der Weiterleitung der Schmerzreize bis zu einer möglichen Regeneration der Nervenendigungen. Der TRPV1-Rezeptor wurde auch beim Hund beschrieben (PHELPS et al. 2005), was die Vermutung nahe legt, dass eine Schmerzreduktion mit Capsaicin auch beim Hund erreicht werden kann.

Die Anwendung von Capsaicin bei OA wurde in verschiedenen Tierversuchen getestet. INMAN et al. (1989) beschrieben bei Katzen eine Verbesserung der Entzündung bei experimentell induzierter Synovitis durch eine intraartikuläre Gabe von Capsaicin. DAVIS et al. (1993) zeigten in einem Tierversuch, dass subcutan injiziertes Capsaicin (3-9 mg/kg) bei Ratten eine Reduktion der Arthritis-Schmerzen in Kniegelenken bewirkte. In der Humanmedizin konnte in mehreren Phase I/II Studien durch intraartikuläre Injektionen von Capsaicin erfolgreich eine Desensibilisierung und Schmerzreduktion in Gelenken erzielt werden. Diese Effekte traten dosisabhängig auf (CANTILLON et al. 2005; MAHOWALD et al. 2006). In bestimmter Konzentration kann intraartikulär injiziertes Capsaicin die für eine OA typischen Schmerzen für einen längeren Zeitraum deutlich reduzieren (ANON. 2009).

Weitere tierexperimentelle Studien mit Capsaicin beschäftigten sich mit der Ausschüttung von Neuropeptiden bei induzierter OA. An der Entstehung von Schmerzen sind Nozizeptoren, vielfach verzweigte Endigungen von sehr dünnen Nervenfasern beteiligt. Diese Rezeptoren produzieren und speichern Neuropeptide, besonders CGRP und SP, die bei Erregung freigesetzt werden (SCHMIDT 2002). Capsaicin ist in der Lage, anfänglich die Freisetzung von Neuropeptiden wie SP und CGRP zu induzieren (HOLZER 1991). In einem Versuch mit Katzen konnten MARSHALL et al. (1997) zeigen, dass durch eine Capsaicininjektion in ein arthritisches Kniegelenk die Mengen an SP und CGRP im Gegensatz zu nicht behandelten arthritischen Kniegelenken deutlich reduziert waren. Diese Reduktion lässt sich durch die zunächst starke Freisetzung von SP und die darauf folgende Reduktion der Axonterminalen erklären. Eine Verbesserung der Entzündungsreaktion im Gelenk trat jedoch nicht auf (MARSHALL et al. 1997). Intraartikuläre Injektionen einer gering konzentrierten Capsaicin-Lösung (0,1%-0,25%) in Ratten-Kniegelenke zeigten keinen Effekt, während bei höheren Konzentrationen (ab 0,5%) eine deutliche Reduktion an Neuropeptiden zu verzeichnen war (MAPP et al. 1996). Ein zusätzlicher Befund bei der Injektion des höher konzentrierten Capsaicins war eine starke Entzündungsreaktion im Gelenk. Ursache könnte eine Zerstörung sensibler Nervenfasern sein (MAPP et al. 1996).

Da Capsaicin schon in vielen *in vivo* Studien in der Humanmedizin und an Versuchstieren getestet wurde, konnte dieser Therapieversuch bei klinisch kranken Hunden in der Kleintierklinik der Universität Leipzig durchgeführt werden, da bei diesen Patienten keine zufriedenstellende Besserung mit verfügbaren Tierarzneimitteln erreicht werden konnte. Im Rahmen der Umwidmungskaskade konnte Capsaicin für einen Therapieversuch an ausgewählten Patienten eingesetzt werden.

Zur intraartikulären Behandlung mit Capsaicin wurden zwei Hunde ausgewählt, die beide unter einer deutlichen Lahmheit der Vordergliedmaße litten. Bei beiden Patienten konnte mittels bildgebender Verfahren eine hochgradige OA diagnostiziert werden. Die Auswertung aller Befunde wurde von mir durchgeführt und in dieser Arbeit beschrieben.

Die Injektion des Capsaicins bei Hunden ist nur unter Allgemeinanästhesie möglich. Trotz der Narkose wurde vor der Behandlung bei diesen zwei Hunden intraartikulär zur örtlichen Betäubung Lidocain verabreicht, um Schmerzen, die durch die anfänglich starke Capsaicin-Reizung hervorgerufen werden, zu verhindern. Lidocain wurde ausgewählt, da es eine starke, schnell beginnende lokale Betäubung hervorruft. Durch seine zudem nur kurze Wirkung interagiert es später nicht mit dem injizierten Capsaicin (ANON.

2009). Um die Gelenkkapsel nicht zu überdehnen, wurde das Lidocain kurz vor der Capsaicin-Injektion wieder entfernt.

In klinischen Studien der Humanmedizin erfolgten alle Behandlungen unter örtlicher Betäubung mit Lidocain. Es wurden die verschiedenen Dosierungen 10 µg, 100 µg, 300 µg und 1000 µg Capsaicin pro Gelenk getestet. Bei allen Patienten gab es eine stärkere Reduktion der Schmerzen im Vergleich zur Placebogruppe. Es traten keine systemischen Nebenwirkungen oder Schwellungen an der Injektionsstelle auf und das Capsaicin hatte keinen Effekt auf die Propriozeption.

Bei einer Dosis von 1000 µg Capsaicin/ Gelenk beim Menschen war die Schmerzreduktion deutlich stärker als bei den niedrigeren Dosierungen, allerdings traten kurz nach der Injektion starke brennende Schmerzen auf (CANTILLON et al. 2005).

Für unsere Studie sollte jeder Hund eine Dosis von 250 mg Capsaicin pro Gelenk erhalten. Diese Dosis erscheint zunächst im Vergleich zu den oben genannten humanmedizinischen Dosierungen, sehr hoch, wurde allerdings aus folgenden Gründen ausgewählt:

- Bei allen bisher publizierten Studien war die Wirksamkeit des Capsaicins dosisabhängig, wobei bei höheren Dosen eine stärkere Wirksamkeit festgestellt werden konnte.
- Bei höheren Dosierungen zeigten sich in der Humanmedizin starke, brennende Schmerzen, welche bei unseren Hunden aufgrund der durchgeführten Allgemeinanästhesie in Kombination mit der örtlichen Betäubung jedoch zunächst vernachlässigbar schienen.
- Die Regenerationszeit der Nervenendigungen nach der Therapie liegt beim Menschen bei ca. 12-16 Wochen (POLYDEFKIS et al. 2003; SIMONE et al. 1998). Da die Behandlung bei Hunden immer mit einer Vollnarkose verbunden ist, sollte eine möglichst lange, starke Denervation erreicht werden.

Vor der Verwendung dieser Dosis kontaktierten wir Experten von „Neurobiomedica.org“, die uns mitteilten, dass es möglich sei, diese Dosis bei Hunden zu verwenden.

Hund I erhielt somit 1,5 ml Lidocain und eine Dosis von 250 mg Capsaicin gelöst in 1,5 ml NaCl. Während und kurz nach der Injektion zeigte dieser Patient eine Steigerung von Herz- und Atemfrequenz, war nach der Behandlung hochgradig schmerzhaft und zeigte am nächsten Tag teilweise neurologische Symptome (Kopfschütteln, unkontrolliertes Laufen, lecken am ganzen Körper), welche sich allerdings unter symptomatischer Behandlung sofort besserten. Aufgrund dieser Befunde erhielt Hund II 5 ml Lidocain zur Betäubung und die Dosis des Capsaicins wurde auf 83 mg reduziert. Bei diesem Patienten wurden keine Nebenwirkungen beobachtet.

CHANDA et al. (2005) beschrieben in einer Toxizitätsstudie an Hunden einen Anstieg der Herzfrequenz, des Blutdruckes und der Atemfrequenz bei einer Dosis von 0,3 mg Capsaicin /kg Körpergewicht intravenös. Diese Wirkungen begannen ca. 2 Minuten nach der Injektion und besserten sich ohne weitere Therapie nach 5 bis 10 Minuten wieder. Bei dieser Dosis gab es auch messbare Plasmaspiegel bei den Hunden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Langzeiteffekt von Capsaicin bei Hunden getestet, welche über vierzehn Tage täglich 0,3 mg/kg Capsaicin erhielten. Diese Hunde zeigten Lautäußerungen während der Injektion und leichten Tremor (Kopf, Körper, Gliedmaßen). Zum Teil traten Schwellungen und Lahmheiten während der Versuchsperiode auf (CHANDA et al. 2005). Des weiteren wird Capsaicin jedoch schnell vom Körper

ausgeschieden und verursacht keine langanhaltenden Nebenwirkungen (CHANDA et al. 2005). PAN und CHEN (2004) zeigten bei Frettchen, dass es durch die Reizung von Capsaicin Rezeptoren in pericardialen sensiblen Nervenfasern zu einer Herzfrequenzerhöhung kommt. In unserem Fall scheint es möglich, dass durch die bei uns verwendete hohe Dosis ein hoher Plasmaspiegel hervorgerufen wurde, wodurch Capsaicin Rezeptoren in pericardialen Nervenfasern die bei uns festgestellten Frequenzerhöhungen induziert haben könnten.

Bei beiden Hunden, die in der Leipziger KTK eine Capsaicin Injektion erhielten, konnte keine Besserung der Lahmheit erzielt werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben.

Die Schmerzen, die bei einer OA auftreten, können aus allen Bereichen des Gelenkes stammen, außer vom aneuralen Knorpel (FOX 2010). Daher kann bei einer chronischen OA auch eine stark verspannte Muskulatur eine Schmerzquelle darstellen (CREAMER 2004), an der das Capsaicin keine Wirkung entfalten kann. Durch die häufig dauerhafte Fehlbelastung der Gliedmaßen kommt es oft auch zu einer Atrophie der Muskulatur, welche dann ebenfalls mit Schmerzen und Unbeweglichkeit einhergeht (FOX und COOK 2001). Auch in diesem Fall wäre das Capsaicin nicht wirksam.

Zudem konnten bei unseren Patienten mittels bildgebender Diagnostik eine hochgradige OA und zum Teil mittelgradige osteophytäre Zubildungen diagnostiziert werden, welche ebenfalls eine Schmerzquelle darstellen können, da sie mit sensiblen Nerven durchsetzt sind (SURI et al. 2007).

Bei beiden Hunden konnte ein FCP nicht ausgeschlossen werden, welcher für eine Instabilität im Gelenkbereich verantwortlich sein kann.

Eine weitere Ursache für das Therapieversagen kann ein Fehlen des TRPV1 Rezeptors für Capsaicin an den Nervenfasern im Gelenkbereich der therapierten Hunde sein. Bei der Maus exprimieren fast ausschließlich sensible Neurone diesen Rezeptor (CATERINA et al. 1997). In molekularbiologischen Studien wurde dieser Rezeptor beim Hund nachgewiesen, strukturell jedoch nicht zugeordnet (PHELPS et al. 2005).

Sollte Capsaicin aufgrund der Erfolge in der Behandlung der humanen OA auch beim Hund nochmals als Therapieversuch in Frage kommen, muss Capsaicin in Vorversuchen und in klinischen, randomisierten und placebo- kontrollierten Doppelblindstudien getestet werden.

5.3 Botox- Injektion

Botox enthält als Wirkstoff BTA. Dieses Neurotoxin führt durch Hemmung der Acetylcholinfreisetzung an der motorischen Endplatte zu einer schlaffen Lähmung der Muskulatur (SEIL et al. 2010; SCHANTZ und JOHNSON 1992). Die schmerzreduzierende Wirkung von BTA ist meist auf die reduzierte Muskelaktivität zurückzuführen (HADLEY et al. 2010). Studien an Nagetieren bestätigten, dass BTA auch die Freisetzung von diversen Neurotransmittern hemmt, welche an der Schmerzentstehung beteiligt sind. BTA blockiert damit direkt die periphere und indirekt die zentrale Sensibilisierung (AOKI 2003).

In der Humanmedizin wurde BTA intraartikulär bei Patienten mit OA im Schulter-, Ellbogen- und Kniegelenk injiziert und führte dort nach ca. vier bis zehn Wochen zu einer drei bis zwölf Monate

andauernden deutlichen Schmerzreduktion und Verbesserung der Beweglichkeit ohne sofortige oder spätere Nebenwirkungen (MAHOWALD et al. 2006). Obwohl dies eine kleine Studie ohne Kontrollgruppe war, scheint die Anwendung von BTA sicher zu sein. Die Ergebnisse zeigen, das Botox ein effektives Neurotoxin zur Schmerzbehandlung sein könnte (HADLEY et al. 2010). In einer kürzlich veröffentlichten Studie, wurden fünf, an Arthrose erkrankte Hunde mit Botox behandelt. Alle Hunde erhielten je 25 Einheiten Botox in das erkrankte Gelenk (2 Ellbogen, 3 Hüftgelenke). Die Beurteilung durch die Besitzer ergab bei vier Hunden eine Verbesserung, bei einem Hund keine Veränderung. Eine Ganganalyse mittels einer Plattform zeigte bei allen Hunden eine leichte Verbesserung der Lahmheit für eine gewisse Zeit nach der Injektion (HADLEY et al. 2010). Die Besitzer führten ihre bisherige OA- Therapie mittels NSAIDs während der Studie weiter (HADLEY et al. 2010).

Diese Behandlung mittels Botox wurde an vier Hunden, die unter einer deutlichen Lahmheit der Vordergliedmaße litten, in der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig im Jahr 2006 und 2007 durchgeführt. Die Therapieversuche waren im Rahmen der Umwidnungskaskade für Medikamente in der Tiermedizin möglich, da kein verfügbares Tierarzneimittel eine zufriedenstellende Schmerzreduktion erreichen konnte. Die Befunde wurden von mir ausgewertet und in dieser Arbeit vorgestellt.

Die Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung erfolgte nach den Angaben auf dem Beipackzettel des BTA. Die geplante Dosis orientierte sich an den, in der Humanmedizin verwendeten Einheiten (50 – 100 Einheiten Botox pro Gelenk) (SINGH et al. 2010).

Die Hunde I, II und III erhielten pro Gelenk zunächst 50 Einheiten Botox. Hund IV erhielt eine Injektion von 100 Einheiten. Der Therapieerfolg wurde durch die Einschätzung des Besitzers und durch regelmäßige vollständige orthopädische Untersuchungen in der Klinik für Kleintiere beurteilt.

Bei keinem der Hunde traten nach der Injektion Nebenwirkungen auf. Dies liegt vor allem an der sehr großen therapeutischen Breite und der streng lokalen Wirkung, wodurch typische metabolische Komplikationen verhindert werden (DRESSLER 2006). In einer humanmedizinischen klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass Botox auch bei sehr hohen Dosen ohne systemische oder toxische Nebenwirkungen angewendet werden kann (DRESSLER 2006).

Nur bei Hund I war die subjektive Einschätzung der Besitzer nach zwei Wochen positiv. Diese berichteten von einer vermehrten Aktivität des Hundes und einer besseren Bewegung. Die Lahmheit war jedoch immer noch präsent und verschlimmerte sich nach Belastung wieder deutlich. Die orthopädischen Untersuchungen ergaben keine Besserung. Bei Hund II und Hund III ergaben sowohl die subjektive Einschätzung der Besitzer als auch die orthopädischen Untersuchungen keine Verbesserungen. Bei Hund IV zeigte die orthopädische Untersuchung eine Verschlechterung der Lahmheit, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit jedoch nicht auf die Botox Behandlung zurück zu führen ist, da diese Verschlechterung erst sechs Wochen nach der Therapie auftrat. Schmerzäußerungen, Schwellungen oder Rötungen konnten nach der Injektion nicht beobachtet werden.

Die Ursachen für das Therapieversagen können vielfältig sein. BTA ist ein körperfremdes Protein, das im Organismus eine Antikörperbildung auslösen kann, die die biologische Wirkung des Toxins ganz oder teilweise blockiert (DRESSLER 2006). Für Botox konnte allerdings eine besonders niedrige Antigenität

nachgewiesen werden, was das Risiko eines antikörpervermittelten Therapieversagens sehr reduziert (JANKOVIC et al. 2003).

In der humanmedizinischen Literatur wird eine deutliche Schmerzreduktion beschrieben. Diese Differenz zu unseren Ergebnisse kann dadurch hervorgerufen werden, dass Botulismus beim Menschen durch *Clostridium botulinum* Typ A,B,E und F hervorgerufen wird, wohingegen der Botulismus beim Hund durch Typ C ausgelöst wird. Es ist also durchaus möglich, dass der Hund für die Effekte von BTA nicht so empfänglich ist (HADLEY et al. 2010). Die BTA Studie an Hunden zeigte eine leichte Verbesserung der Lahmheit bei allen behandelten Hunden, jedoch führten die Besitzer während der kompletten Studie eine Schmerztherapie mittels NSAIDs weiter, was ebenfalls die Verbesserung erklären könnte (HADLEY et al. 2010).

Die Wirksamkeit von BTA scheint beim Hund auch dosisabhängig zu sein. LIN et al. (2007) beschrieben den Effekt von BTA auf die kontraktile Funktion der Prostata beim Hund. 100 Einheiten BTA hatten keinen Effekt, 200 Einheiten führten zu einer erheblichen Reduktion der Kontraktion. Somit könnten die verwendeten Dosierungen während unserer Therapie zu niedrig gewesen sein.

Zwei der von uns behandelten Hunde zeigten röntgenologisch nur geringgradige Arthroseanzeichen. Daher ist es möglich, dass die Schmerzhaftigkeit im Gelenk und die Lahmheit der Tiere in einer anderen Struktur ihren Ursprung hat, wodurch das BTA seine betäubende Wirkung nicht entfalten konnte. Ein Hund zeigte eine sehr hochgradige Arthrose, so dass die Wirksamkeit von Botox evtl. nicht ausreichend sein konnte.

Die Behandlung mit Botox wurde in der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig zudem nur an vier Hunden durchgeführt. Die verwendeten Hunde unterschieden sich in Rasse, Alter und Geschlecht. Die Überprüfung der Behandlung erfolgte subjektiv durch die Besitzer und objektiv nur durch die orthopädische Untersuchung in der Kleintierklinik.

Auch wenn unsere Ergebnisse keinen Therapieerfolg mittels Botox zeigen konnten, gibt es in den klinischen Studien der Humanmedizin Beweise für die schmerzreduzierende Wirkung von intraartikulär injiziertem Botox. Auch in der Veterinärmedizin gibt es Hinweise darauf, dass BTA eine klinische Verbesserung bei OA bewirken kann. Um dies zu bestätigen, sollte BTA in weiteren klinischen, randomisierten und placebo-kontrollierten Doppelblindstudien getestet werden.

5.4 Chemische Denervation im Gelenk beim Hund – Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine der in dieser Arbeit beschriebenen chemischen Denervationsansätze im Gelenk von Hunden zu einer langanhaltenden Schmerzlinderung geführt hat. Es liegen auch nur sehr wenige Referenzdaten aus klinischen Studien beim Hund vor.

Die Anzahl der Hunde, die für die von mir ausgewerteten Studien bzw. Behandlungen zur Verfügung stand, ist auch sehr gering. Eine Kontrollgruppe stand nicht zur Verfügung.

Die Behandlung einer OA zielt vor allem auf eine Schmerzfreiheit oder zumindest eine starke Schmerzreduktion ab, welche durch die Betäubung bzw. die Zerstörung der sensiblen Innervation des Gelenkes möglich scheint. Aufgrund der minimalinvasiven Durchführung und einer möglichen, effektiven

Wirksamkeit der beschriebenen Denervationsansätze sollte dies optimiert werden. In Vorversuchen muss ermittelt werden, welche Dosierungen, Konzentrationen und Wartezeiten für diese Studien optimal sind.

Die intraartikuläre Injektion von Capsaicin bzw. Botox führte beim humanen Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der Beweglichkeit und Verminderung von Schmerzen. Auch in der Veterinärmedizin gibt es Hinweise auf eine erfolgreiche Schmerzbehandlung mittels der oben genannten Substanzen. In den von mir ausgewerteten Therapieversuchen beim Hund konnte keine Verbesserung der klinischen Symptome der OA diagnostiziert werden. Für zukünftige Studien sollte die Anzahl der Patienten deutlich erhöht werden und Therapieerfolge mittels einer Ganganalyse in der Klinik objektiv diagnostiziert werden.

Für die irreversible Zerstörung der afferenten Innervation des Ellbogengelenks wurde das Toxin „OX7-Saporin“ verwendet, welches bei drei Beagle- Hündinnen in einem Tierversuch intraartikulär in das linke Ellbogengelenk injiziert wurde. Zur Kontrolle der Wirksamkeit wurde 15 Tage nach der Injektion der retrograde, neuronale Tracer FG in beide Ellbogengelenke appliziert, wobei das rechte Gelenk als Kontrolle dienen sollte. Bei erfolgreicher Denervation wäre FG auf der linken Seite nicht retrograd zu den Spinalganglien transportiert worden, während der Tracer auf der rechten Seite eine selektive Markierung von Neuronen in Spinalganglien bewirkt hätte. Grundlegende Fehler im Versuchsansatz haben dazu geführt, dass sowohl das retrograde Tracing mit FG als auch die OX7-Saporin Injektion nicht erfolgreich waren.

Vergleichbare Studien an Ratten und anderen Spezies lassen jedoch vermuten, dass dieser experimentelle Ansatz zur Denervation im Gelenk auch beim Hund zur Behandlung der OA eingesetzt werden kann.

6 Zusammenfassung

Jenny Fischer

Morphologische und klinische Untersuchungen zur experimentellen Denervation des Ellbogengelenks beim Hund

Veterinär-Anatomisches Institut und Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im November 2011

81 Seiten, 30 Abbildungen, 8 Tabellen, 251 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Osteoarthritis (OA), Ellbogengelenk, Denervation, Saporin, Capsaicin, Botox

Die Osteoarthritis (OA) des Ellbogengelenks ist eine der wichtigsten Gelenkerkrankungen des Hundes, die sich aufgrund erblich bedingter Fehlstellung der Gelenke sekundär häufig schon bei sehr jungen Hunden entwickelt und zu einer verminderten Lebensqualität der Tiere führt. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu einer Schädigung des Gelenkknorpels, der an Elastizität und Spannkraft verliert und seine Funktion, nicht mehr ausüben kann. Eine Ablösung von Knorpelfragmenten und Entzündungen im Gelenk können die Zerstörung des Gelenkknorpels beschleunigen. Die OA ist nicht heilbar. Das Therapieziel ist eine möglichst vollständige Schmerzreduktion und die Verbesserung der Lebensqualität. Eine chirurgische Denervation ist im Ellbogengelenk des Hundes ohne Traumatisierung anatomischer Strukturen nicht möglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erstmalig einen experimentellen Ansatz zur chemischen Denervation sensibler Gelenkafferenzen im Ellbogengelenk beim Beagle mit dem Neurotoxin OX7-Saporin durchzuführen. Zusätzlich wurden Substanzen aus der Humanmedizin zur Schmerzreduktion und symptomatischen Therapie der OA am Hund erprobt und der Therapieerfolg evaluiert.

Im Rahmen eines Therapieversuches in der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig wurde bei zwei, an OA erkrankten Hunden Capsaicin einmalig intraartikulär injiziert. Der erste Hund erhielt intraartikulär 250 mg Capsaicin. Dieser Patient zeigte Nebenwirkungen in Form einer Herz- und Atemfrequenzerhöhung, starker Schmerzhaftigkeit und neurologischen Symptomen. Der zweite Hund wurde mit 83 mg Capsaicin behandelt und zeigte keine Nebenwirkungen. Sowohl die Bewertung der Besitzer als auch die orthopädische Untersuchung ergaben keine Verbesserung der Lahmheit.

Vier kranken Hunden wurde ebenfalls im Rahmen eines Therapieversuches Botox (Botulinumtoxin A) intraartikulär einmalig injiziert. Drei Hunde wurden mit 50 Einheiten, ein Hund mit 100 Einheiten Botox behandelt. Die Applikation von Capsaicin und Botox führten zu keiner Verbesserung der Symptomatik.

In der Humanmedizin ist die Schmerzbehandlung mit Capsaicin und Botox erfolgreich. Deshalb sollten diese Therapieansätze auch für die Anwendung beim Hund weiter optimiert werden.

Das Neurotoxin OX7-Saporin wurde in einer Dosierung von 100 µg erstmalig in das Ellbogengelenk von drei Beagle-Hündinnen appliziert, um eine sensible Denervation des Gelenkes zu erreichen. Der retrograde

Transport des Ribosomen-inaktivierenden Proteins in die Perikarya der Spinalganglienzellen, die das Ellbogengelenk sensibel innervieren, sollte eine selektive Zerstörung der Neurone durch das Neurotoxin bewirken. Der retrograde Tracer Fluoro-Gold wurde, zur Kontrolle der Wirkung des Neurotoxins, nach einer Wartezeit von 15 Tagen intraartikulär in das linke und das rechte Ellbogengelenk appliziert. Fluoro-Gold kann ausschließlich von intakten Nervenfasern transportiert werden. Die Ganglien C4 - Th3 wurden bilateral zur histologischen Auswertung entnommen und in Paraffin eingebettet. Zur Bestimmung der Gesamtneuronenanzahl wurden alle Neurone in jedem dritten Schnitt eines Ganglions gezählt. Die Summe dieser Nervenzellen ergab die Gesamtneuronenanzahl eines Ganglions.

Die Einlagerung von Lipofuszin führte zu einer starken Autofluoreszenz im Zytoplasma der Neuronen. Alle Schnitte wurden mit Sudan-Schwarz gefärbt, um die Autofluoreszenz von der retrograden FG-Markierung zu unterscheiden. Die FG-Markierung konnte nur in den Ganglien C6 und Th1 im Zytoplasma sehr weniger Neuronen dokumentiert werden. Der histologische Nachweis einer Neurodegeneration nach Applikation des Neurotoxins OX7-Saporin in das linke Ellbogengelenk war negativ. In den untersuchten Spinalganglien wurden intakte Nervenzellen nachgewiesen.

Auch die bilaterale intraartikuläre Injektion des retrograden Tracers FG war nicht erfolgreich.

Aus den Ergebnissen dieser experimentellen Ansätze wird zusammenfassend geschlussfolgert:

- Vor der Durchführung zukünftiger experimenteller Untersuchungen beim Hund muss die optimale Konzentration und die Wartezeit für das Neurotoxins OX7-Saporin ermittelt werden.
- Die Rezeptoren für OX7-Saporin müssen an den Nervenzellen des Hundes zweifelsfrei nachgewiesen werden, bevor das Neurotoxin im caninen Tiermodell eingesetzt werden kann.
- Die optimale Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes FG für intraartikuläre Injektionen und dessen retrograde Transportgeschwindigkeit beim Hund müssen ermittelt werden, bevor dieser Tracer wieder im Tierexperiment eingesetzt werden kann.
- FG wurde als 1,8%ige Lösung in das Ellbogengelenk beim Beagle appliziert. Diese Konzentration war wahrscheinlich zu gering, um eine retrograde Markierung der sensiblen Neurone in den entsprechenden Spinalganglienzellen nachzuweisen.
- Die intraartikuläre Applikation des Neurotoxins OX7-Saporin führte nicht zur selektiven Neurodegeneration. Eine Aussage zur Schmerzausschaltung und symptomatischen Therapie der OA des Hundes mit OX7-Saporin ist deshalb nicht möglich.

7 Summary

Jenny Fischer

Morphologic and clinical examination of experimental denervation of the canine elbow joint

Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in November 2011

81 pages, 30 figures, 8 tables, 251 references

Keywords: osteoarthritis (OA), elbow joint, denervation, Saporin, Capsaicin, Botox

Osteoarthritis of the elbow joint is one of the dog's most important arthropathy that secondarily often develops already in the first years of a dog's life due to inherited joint malignment and leads to a reduced quality of life. During the disease, it leads to a degeneration of the articular cartilage which loses its elasticity and cannot fulfil its function any more. A detachment of cartilage fragments and joint inflammation may accelerate the destruction of the articular cartilage. OA is not curable. The issue of the therapy is as complete as possible pain reduction and an improvement of the quality of life. A surgical denervation in the dog's elbow joint is not possible without traumatization of anatomic structures.

The aim of the present study is to carry out an experimental approach to the chemical denervation of sensory joint afferents in the Beagle's elbow joints with the neurotoxin OX7-Saporin. In addition, substances of the human medicine for pain reduction and symptomatic therapy of OA were tested on dog's elbow joint and the therapy success was evaluated.

Within a therapeutical approach of the Department of Small Animal Medicine at the University of Leipzig, two dogs suffering from OA once received an intra-articular injection of capsaicin. The first dog received 250 mg of Capsaicin. The patient showed side effects like increase of heart and breathing rate, strong painfulness and neurological symptoms. The second dog received 83 mg of Capsaicin. This dog tolerated the injection well without immediate adverse effects. Both the owner's evaluation and orthopedic examinations did not show any clinical improvement.

Within another therapeutical approach, four dogs suffering from OA once received an intra-articular injection of Botox (Botulinumtoxin type A). Three dogs received 50 units and one dog 100 units of Botox. The application of Capsaicin and Botox did not improve the symptoms.

In the human medicine, the pain treatment with Capsaicin and Botox is successful. Therefore these therapeutical approaches should be kept on optimizing when using those preparations for dogs.

The neurotoxin OX7-Saporin was once applied in a dose of 100 µg into the elbow joint of three female Beagle dogs to reach a sensory denervation of the joint. The retrograde transport of the ribosome-inactivating protein to the neurons of the dorsal root ganglia that lead to a sensory innervation of the elbow joint, should cause a selective destruction of specific types of neurons by the neurotoxin. To control the effect of OX7-

Saporin, the retrograde tracer Fluoro-Gold was applied intra-articularly into the left and right elbow joint after a waiting time of 15 days. Fluoro-Gold can only be transported by intact nerve fibres. The ganglia C4 – Th3 were removed and paraffin-embedded for histological evaluation. To determine the number of neurons in dorsal root ganglia all neurons were counted in every third section of a ganglion. The sum of these nerve cells result in the total number of neurons of dorsal root ganglia.

The accumulation of lipofuscin led to a strong autofluorescence in the cytoplasm of the neurons. All sections were treated with a solution of Sudan Black to differ the autofluorescence from the retrograde FG-labeling. The FG-labeling could only be detected in the cytoplasm of very few neurons of the ganglia C6 and Th1. After the application of the neurotoxin OX7-Saporin in the left elbow joint, no histological evidence of neurodegeneration was observed. Only intact neurons were detected in the examined dorsal root ganglia.

Also the bilateral intra-articular injection of the retrograde tracer FG was not successful.

With these experimental approaches the following conclusions are drawn:

- Before the conducting of a future experimental examination of a dog, the optimum concentration and waiting time for the neurotoxin OX7-Saporin are to be determined.
- The receptors for OX7-Saporin are definitively to be proven on dog's nerve cells before the neurotoxin can be used in the canine animal model.
- The optimum concentration of the fluorescence dye FG for intra-articular injection and its duration of retrograde transport in dogs are to be evaluated before this tracer can be used in an animal experiment again.
- FG was applied as a 1.8 % solution in the canine elbow joint. This concentration was probably too low to prove a retrograde labeling of sensory neurons in the dorsal root ganglia.
- The intra-articular application of the neurotoxin OX7-Saporin did not lead to a selective neurodegeneration. Therefore, a statement about an antinociceptive effect and symptomatic therapy of dog's suffering from OA with OX7-Saporin cannot be made.

8 Literaturverzeichnis

Ades EW, Zwerner RK, Acton RT, Balch CM. Isolation and partial characterization of the human homologue of Thy-1. J Exp Med. 1980;151:400-6.

Akatsuka M, Yamamoto Y, Tobetto K, Yasui T, Ando T. In vitro effects of hyaluronan on prostaglandin E2 induction by interleukin-1 in rabbit articular chondrocytes. Agents Actions. 1993;38:122-5.

Anon. Advanced targeting systems 2004 (zitiert vom 01.12.2010): 1-2,
<http://www.atsbio.com/searchframe.html>

Anon. Algorx Pharmaceuticals (zitiert vom 03.06.2009):1, <http://www.algorx.com/products/4975.htm>

Anon. Elektrische Muskelstimulation/Transkutane elektrische Nervenstimulation 2010 (zitiert vom 08.10.2010):1, <http://ems-tens.com/allgemeine-infos/tens.htm>

Anon. Schmerzen und Progression bei der Osteoarthritis des Hundes. Deutsches Tierärzteblatt 2009:1601

Aoki KR. Evidence for antinociceptive activity of botulinum toxin type A in pain management. Headache. 2003;43 Suppl 1:9-15.

Auer JA, Fackelman GE, Gingerich DA, Fetter AW. Effect of hyaluronic acid in naturally occurring and experimentally induced osteoarthritis. Am J Vet Res. 1980;41:568-74.

Aydelotte MB, Kuettner KE. Heterogeneity of articular chondrocytes and cartilage matrix. In: Woessner JF, Howell DS, Hrsg. Joint cartilage degradation . Basic and clinical aspects. New York: Marcel Dekker; 1993.

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:1751-6.

Balazs EA, Watson D, Duff IF, Roseman S. Hyaluronic acid in synovial fluid. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritis human fluids. Arthritis Rheum. 1967;10:357-76.

Baranowski AP, Anand U, McMahon SB. Retrograde labelling of dorsal root ganglion cells in the rat: a quantitative and morphological comparison of Fluoro-Gold with horseradish peroxidase labelling. Neurosci Lett. 1992;141:53-6.

Beale BS. Use of nutraceuticals and chondroprotectants in osteoarthritic dogs and cats. Vet Clin N Am Small Anim Pract. 2004;34:271-89.

Bennett D, May C. Joint diseases of dogs and cats. In: Anon. Textbook of veterinary internal medicine. 4. Aufl. London, Philadelphia, Saunders; 1995. S. 2032-77.

- Berg R, Koch T. Gelenk- und Bänderlehre, Arthrologie und Syndesmologie. In: Berg R, Hrsg. Lehrbuch der Veterinär-Anatomie, Band I. 5. Aufl. Gustav Fischer Verlag; 1992. S. 210-1.
- Bergman E, Ulfhake B. Loss of primary sensory neurons in the very old rat: neuron number estimates using the disector method and confocal optical sectioning. J Comp Neurol. 1998;396:211-22.
- Birbaumer, Schmidt RF. Biologische Psychologie. 4 Aufl. Heidelberg, Berlin, New York, Tokyo: Springer Verlag; 1999.
- Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). Neurosci Lett. 2008;437:199-202.
- Bockstahler B, Levine D, Millis D. Physiotherapie auf den Punkt gebracht. 1 Aufl. BE VetVerlag; 2004.
- Bockstahler B. Physiotherapie zur Linderung schmerzhafter Arthrosen. Proceedings des 4. Leipziger Tierärztekongresses; 2008 17.-19.Januar; Leipzig
- Bolz W, Dietz O. Lehrbuch der allgemeinen Chirurgie für Tierärzte. 5 Aufl. Stuttgart: Ferdinand-Enke Verlag; 1985.
- Boniface RJ, Cain PR, Evans CH. Articular responses to purified cartilage proteoglycans. Arthritis Rheum. 1988;31:258-66.
- Boon AJ, Smith J, Dahm DL, Sorenson EJ, Larson DR, Fitz-Gibbon PD et al. Efficacy of intra-articular botulinum toxin type A in painful knee osteoarthritis: a pilot study. PM R. 2010;2:268-76.
- Boroffka S. Die Röntgentherapie bei chronisch-degenerativen Gelenkentzündungen des Hundes [Dissertation vet.med]. Berlin:Veterinärmedizinische Fakultät der Freien Universität Berlin; 1995.
- Böttcher P, Grevel V. Lifting für das arthrotische Ellbogengelenk: Botox und andere Wundermittel. Proceedings des 4. Leipziger Tierärztekongresses; 2008 17.-19.Januar; Leipzig
- Bright JM, Sullivan PS, Melton SL, Schneider JF, McDonald TP. The effects of n-3 fatty acid supplementation on bleeding time, plasma fatty acid composition, and in vitro platelet aggregation in cats. J Vet Intern Med. 1994;8:247-52.
- Brunnberg L, Waibl H. Osteochondrosis dissecans der Trochlea humeri und /oder Fraktur des Processus coronoideus medialis ulnae beim Hund. Tagungsband der 32 Jahrestagung der DVG Fachgruppe "Kleintierkrankheiten" 1986
- Buchholz J. Die Strahlentherapie zur Linderung schmerzhafter Arthrosen. Proceedings des 4. Leipziger Tierärztekongresses; 2008 17.-19.Januar; Leipzig

- Buder A. Diagnostische Analgesie zur Untersuchung von Lahmheiten am Ellbogen- und Kniegelenk des Hundes. [Dissertation med. vet]. Giessen: Justus-Liebig-Universität Gießen. 2005.
- Budsberg SC, Bartges JW. Nutrition and osteoarthritis in dogs: does it help? *Vet Clin N Am Small Anim Pract.* 2006;36:1307-23.
- Bui LM, Bierer TL. Influence of green lipped mussels (*Perna canaliculus*) in alleviating signs of arthritis in dogs. *Vet Ther.* 2003;4:397-407.
- Bullough PG. Atlas of orthopedic pathology. London: Gower; 1992.
- Cantillon M, Vause E, Sykes D, Moon A, Hughes S. Safety, tolerability and efficacy of ALGRX 4975 in Osteoarthritis (OA) of the knee. *J Pain.* 2005;6:39.
- Castor CW, Prince RK, Hazelton MJ. Hyaluronic acid in human synovial effusions; a sensitive indicator of altered connective tissue cell function during inflammation. *Arthritis Rheum.* 1966;9:783-94.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997;389:816-24.
- Chanda S, Mould A, Esmail A, Bley K. Toxicity studies with pure trans-capsaicin delivered to dogs via intravenous administration. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2005;43:66-75.
- Choi D, Li D, Raisman G. Fluorescent retrograde neuronal tracers that label the rat facial nucleus: a comparison of Fast Blue, Fluoro-ruby, Fluoro-emerald, Fluoro-Gold and DiI. *J Neurosci Methods.* 2002;117:167-72.
- Clapham DE, Runnels LW, Strubing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2001;2:387-96.
- Colpaert FC, Donnerer J, Lembeck F. Effects of capsaicin on inflammation and on the substance P content of nervous tissues in rats with adjuvant arthritis. *Life Sci.* 1983;32:1827-34.
- Comer JS, Kincaid SA, Baird AN, Kammermann JR, Hanson RR, Jr., Ogawa Y. Immunolocalization of stromelysin, tumor necrosis factor (TNF) alpha, and TNF receptors in atrophied canine articular cartilage treated with hyaluronic acid and transforming growth factor beta. *Am J Vet Res.* 1996;57:1488-96.
- Cox SR, Liao S, Payne-Johnson M, Zielinski RF, Stegemann MR. Population pharmacokinetics of mavacoxib in osteoarthritic dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2010.
- Crawford JM, Barton RW. Thy-1 glycoprotein: structure, distribution, and ontogeny. *Lab Invest.* 1986;54:122-35.

- Creamer P. Current perspectives on the clinical presentation of joint pain in human OA. In: Wiley. Osteoarthritic joint pain. John Wiley and Sons.; 2004. S. 64-78.
- Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. J Rheumatol Suppl. 1997;49:15-9.
- Cruwys SC, Garrett NE, Kidd BL. Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. Neurosci Lett. 1995;193:205-7.
- Dalchau R, Fabre JW. Identification and unusual tissue distribution of the canine and human homologues of Thy-1 (theta). J Exp Med. 1979;149:576-91.
- Dalchau R, Fabre JW. Tissue distribution of brain-thymus shared antigens recognized by anti-brain xenosera in the rat, dog and man. Clin Exp Immunol. 1979;35:425-32.
- Davis A, Perkins MN. The effect of capsaicin and conventional analgesics in two models of monoarthritis in the rat. Agents Actions. 1993;38 Spec No:C10-C12.
- Dämmrich K. Zur Pathogenese der Arthropatia deformans bei Haustieren. Kleintierpraxis. 1978;21:158-66.
- Dejardin LM. TATE: Latest Design in Elbow Replacement, Surgical technique and early clinical results. Veterinary Symposium; 2009 Okt 6-7; Washington DC
- Dobenecker B, Beetz Y, Kienzle E. A placebo-controlled double-blind study on the effect of nutraceuticals (chondroitin sulfate and mussel extract) in dogs with joint diseases as perceived by their owners. J Nutr. 2002;132:1690S-1S.
- Dressler D. Pharmacological aspects of therapeutic botulinum toxin preparations. Nervenarzt. 2006;77:912-21.
- Durham PL, Cady R, Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A: implications for migraine therapy. Headache. 2004;44:35-42.
- Elain-Sergent MC. Données actuelles concernant l'intérêt de l'administration per os de glycosaminoglycanes pour la prévention et le traitement de l'arthrose chez le chien. ENVA. 2008.
- Engelhardt W, Brewes G. Physiologie der Haustiere. Hippokrates; 2000.
- Evanich JD, Evanich CJ, Wright MB, Rydlewicz JA. Efficacy of intraarticular hyaluronic acid injections in knee osteoarthritis. Clin Orthop Relat Res. 2001;173-81.
- Fassbender HG. Die Bedeutung entzündlicher Prozesse bei der Osteoarthrose. Z Rheumatol. 1983;42:145-52.

- Felson DT, Zhang Y, Anthony JM, Naimark A, Anderson JJ. Weight loss reduces the risk for symptomatic knee osteoarthritis in women. The Framingham Study. *Ann Intern Med.* 1992;116:535-9.
- Fernandez FR, Grindem CB, Lipowitz AJ, Perman V. Synovial fluid analysis: Preparation of smears for cytologic examination of canine synovial fluid. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1983;19:727-34.
- Ferreras JM, Barbieri L, Girbes T, Battelli MG, Rojo MA, Arias FJ et al. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28 S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). *Biochem Biophys Acta.* 1993;1216:31-42.
- Fiorentino PM, Tallents RH, Miller JN, Brouxhon SM, O'Banion MK, Puzas JE et al. Spinal interleukin-1beta in a mouse model of arthritis and joint pain. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3100-9.
- Fitzgerald M, Woolf CJ. The time course and specificity of the changes in the behavioural and dorsal horn cell responses to noxious stimuli following peripheral nerve capsaicin treatment in the rat. *Neuroscience.* 1982;7:2051-6.
- Fox DB, Cook JL. Synovial fluid markers of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219:756-61.
- Fox SM. Chronic pain in small animal medicine. Manson publishing/The veterinary press; 2010.
- Fölsch, Kochsiek K, Schmidt RF. Pathophysiologie. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag; 2000.
- Frost-Christensen LN, Lefebvre F, Mastbergen SC, Garssen J, Hartag A, Hazewinkel HAW. Effekt of glucosamine combined with omega-3 fatty acids on the development of canine experimental osteoarthritis. Proceedings des 13. ESVOT Kongress, 2006, 7.-10. September, München, Deutschland. p. 155.
- Gannon JR. Clinical experiences with intravenous use of sodium hyaluronate in racing greyhounds. *Aust Vet J.* 1998;76:474-5.
- Garrett WT, McBride RL, Williams JK, Jr., Feringa ER. Fluoro-Gold's toxicity makes it inferior to True Blue for long-term studies of dorsal root ganglion neurons and motoneurons. *Neurosci Lett.* 1991;128:137-9.
- Gaustad G, Larsen S. Comparison of polysulphated glycosaminoglycan and sodium hyaluronate with placebo in treatment of traumatic arthritis in horses. *Equine Vet J.* 1995;27:356-62.
- Gillette EL. Principles of radiation therapy. In: Theilen GH, Madewill BR, Hrsg. *Veterinary cancer medicine.* 2. Aufl. Lea & Febiger; 1987. S. 137-43.
- Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res.* 1999;40:1-11.

- Greisen HA, Summers BA, Lust G. Ultrastructure of the articular cartilage and synovium in the early stages of degenerative joint disease in canine hip joints. *Am J Vet Res.* 1982;43:1963-71.
- Grondalen J, Lingaas F. Arthrosis in the elbow joint of young rapidly growing dogs: A genetic investigation. *J Small Anim Pract.* 1991;32:460-4.
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:183-91.
- Guyton AC, MacDonald MA. Physiology of botulinus toxin. *Arch Neurol Psychiat.* 1947;57:578-92.
- Hadley HS, Wheeler JL, Petersen SW. Effects of intra-articular botulinum toxin type A (Botox) in dogs with chronic osteoarthritis. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2010;23:254-8.
- Handwerker HO. Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag; 1999.
- Hanesch U, Heppelmann B. A simple method for a specific retrograde labelling of dorsal root and sympathetic ganglion cells innervating the knee joint of the cat. *J Neurosci Methods.* 1995;63:55-9.
- Hartung K. Röntgentherapie entzündlicher Erkrankungen beim Hund. *Tierärztl Prax.* 1980;8:363-6.
- Hartung K. Experimentelle Untersuchungen zum Auftreten von Strahlenschäden bei Hunden und Pferden nach der Röntgentherapie. *Berliner Munchener Tierärztl Wochenschr.* 1973;86:201-5.
- Hayashi A, Yanai A, Komuro Y, Nishida M, Inoue M, Seki T. Collateral sprouting occurs following end-to-side neurorrhaphy. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114:129-37.
- Hees. Das kardiovaskuläre System. In: Mosimann W, Kohler T, Hrsg. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. Berlin: Verlag Paul Parey; 1990. S. 84-97.
- Heinrichs K. Superficial thermal modalities. In: Millis DL, Levine D, Taylor RA, Hrsg. Canine rehabilitation and physical therapy. Saunders; 2004. S. 277-88.
- Hellbrekers LJ. Schmerz und Schmerztherapie beim Tier. Schlütersche GmbH&Co KG; 2001.
- Hellstrom LE, Carlsson C, Boucher JF, Michanek P. Intra-articular injections with high molecular weight sodium hyaluronate as a therapy for canine arthritis. *Vet Rec.* 2003;153:89-90.
- Hewicker-Trautwein M, Carter SD, Bennett D, Kelly DF. Immunocytochemical demonstration of lymphocyte subsets and MHC class II antigen expression in synovial membranes from dogs with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;67:341-57.

- Hjelm-Bjorkman A, Tulamo RM, Salonen H, Raekallio M. Evaluating Complementary Therapies for Canine Osteoarthritis Part I: Green-lipped Mussel (*Perna canaliculus*). *Evid Based Complement Altern Med*. 2009;6:365-73.
- Hilbert BJ, Rowley G, Antonas KN. Hyaluronic acid concentration in synovial fluid from normal and arthritic joints of horses. *Aust Vet J*. 1984;61:22-4.
- Hirota W. Intra-articular injection of hyaluronic acid reduces total amounts of leukotriene C4, 6-keto-prostaglandin F1alpha, prostaglandin F2alpha and interleukin-1beta in synovial fluid of patients with internal derangement in disorders of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998;36:35-8.
- Holzer P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 1991;43:143-201.
- Holland TJ. Diseases of joints. In: Jupp KVF, Kennedy PC, Palmer N, Hrsg. *Pathology of domestic animals*. 4. Aufl. Academic Press; 1993. S. 138-80.
- Imhof H, Czerny C, Gahleitner A, Grampp S, Krestan C, Sulzbacher I. Koxarthrose. *Radiologe*. 2002;416-31.
- Inman RD, Chiu B, Rabinovich S, Marshall W. Neuromodulation of synovitis: capsaicin effect on severity of experimental arthritis. *J Neuroimmunol*. 1989;24:17-22.
- Innes J. Quantitative MRI of canine elbow joint. *Proceedings des 15. ESVOT Kongress 2001 15.-18. September, Bologna, Italy*. p. 277-8.
- International Elbow Working Group (IEWG) 2010. (zitiert vom 25.03.2010):1, <http://www.iewg-vet.org/>
- Jaggy A, *Atlas und Lehrbuch der Kleintierneurologie*. 2. Aufl. Schlütersche, 2007
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*. 1977;270:741-3.
- Jankovic J, Vuong KD, Ahsan J. Comparison of efficacy and immunogenicity of original versus current botulinum toxin in cervical dystonia. *Neurology*. 2003;60:1186-8.
- Johansson H, Sjolander P, Sojka P. Receptors in the knee joint ligaments and their role in the biomechanics of the joint. *Crit Rev Biomed Eng*. 1991;18:341-68.
- Johnston SA. Osteoarthritis. Joint anatomy, physiology, and pathobiology. *Vet Clin N Am Small Anim Pract*. 1997;27:699-723.

- Jupp KVF, Kennedy PC. Pathologie of domestic animals. 2 Aufl. New York, London: Academic Press; 1970.
- Kása F, Kása G, Kása A. Entwicklungsstörungen beim juvenilen Hund im Bereich der Gelenke. In: Niemand HG, Suter PF, Hrsg. Praktikum der Hundeklinik. 9. Aufl. 2001. S. 995-1045.
- Keizer SB, Rutten HP, Pilot P, Morre HH, Os JJ, Verburg AD. Botulinum toxin injection versus surgical treatment for tennis elbow: a randomized pilot study. Clin Orthop Relat Res. 2002;125-31.
- Kellgren JH. Some painful joint conditions and their relation to osteoarthritis. Clin Sci. 1939;4:193-205.
- Kellgren JH, SAMUEL EP. The sensitivity and innervation of the articular capsule. J Bone Joint Surg Am. 1950;32:84-91.
- Kelly GS. The role of glucosamine sulfate and chondroitin sulfates in the treatment of degenerative joint disease. Altern Med Rev. 1998;3:27-39.
- Keuttner K, Goldberg VM. Osteoarthritic disorders. American Academy of orthopedic surgeons. Rosemont 1995
- Kietzmann M, Bäumer W. Pharmakologie der Entzündung und der Allergie. In: Frey HH, Löscher W, Hrsg. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 3. Aufl. Enke Verlag; 2010. S. 380-408.
- Kinzel S, Hein S, von SC, Kupper W 10 years experience with denervation of the hip joint capsule for treatment of canine hip joint dysplasia and arthrosis. Berliner Munchener Tierarztl Wochenschr. 2002;115:53-6.
- Kinzel, S; Schneider, M; Stopinski, T; Kombach, G. Die Denervation des Hüftgelenkes: Eine Alternative zur Endoprothetik? Proceedings des 4. Leipziger Tierärztekongresses; 2008 17.-19.Januar; Leipzig
- Kneissl S, Vidoni B. Röntgendiagnostik und sinnvolle Alternativen bei degenerativen Gelenkerkrankungen: Befunde und Differentialdiagnosen. Proceedings des 4. Leipziger Tierärztekongresses; 2008 17.-19.Januar; Leipzig
- Kofler J, Kneissl S, Malleczek D. MRI and CT diagnosis of acute desmopathy of the lateral collateral sesmoidean (navicular) ligament and long-term outcome in a horse. Vet J. 2007;174:410-3.
- Konttinen YT, Kempainen P, Segerberg M, Hukkanen M, Rees R, Santavirta S et al. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. Arthritis Rheum. 1994;37:965-82.

- Korthäuser, Torre. Behandlung deformierender Arthropathien beim Diensthund mit einem Glucosaminoglykanpräparat. *Kleintierpraxis*. 1992;467-78.
- Korvick DL, Pijanowski GJ, Schaeffer DJ. Three-dimensional kinematics of the intact and cranial cruciate ligament-deficient stifle of dogs. *J Biomech*. 1994;27:77-87.
- Kraft W, Dürr UM. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6 Aufl. Schattauer, 2005
- Kramer A, Holsworth IG, Wisner ER, Kass PH, Schulz KS. Computed tomographic evaluation of canine radioulnar incongruence in vivo. *Vet Surg*. 2006;35:24-9.
- Lam FY, Ferrell WR. The neurogenic component of different models of acute inflammation in the rat knee joint. *Ann Rheum Dis*. 1991;747-51.
- Lee PP, Ip MM. Regulation of proliferation of rat mammary tumor cells by inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1992;45:21-31.
- Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, III, Spur BW et al. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med*. 1985;312:1217-24.
- Levine JD, Goetzl EJ, Basbaum AI. Contribution of the nervous system to the pathophysiology of rheumatoid arthritis and other polyarthritides. *Rheum Dis Clin North Am*. 1987;13:369-83.
- Lewis T. Suggestions relating to the study of somatic pain. *Br Med J*. 1938;1:321-5.
- Liebich HG. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. 5 Aufl. Schattauer; 2010.
- Lin AT, Yang AH, Chen KK. Effects of botulinum toxin A on the contractile function of dog prostate. *Eur Urol*. 2007;52:582-9.
- Lucioni A, Bales GT, Lotan TL, McGehee DS, Cook SP, Rapp DE. Botulinum toxin type A inhibits sensory neuropeptide release in rat bladder models of acute injury and chronic inflammation. *BJU Int*. 2008;101:366-70.
- Maccoux LJ, Salway F, Day PJ, Clements DN. Expression profiling of select cytokines in canine osteoarthritis tissues. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;118:59-67.
- Mahowald ML, Singh JA, Dykstra D. Long term effects of intra-articular botulinum toxin A for refractory joint pain. *Neurotox Res*. 2006;9:179-88.
- Mapp PI, Kerslake S, Brain SD, Blake DR, Cambridge H. The effect of intra-articular capsaicin on nerve fibres within the synovium of the rat knee joint. *J Chem Neuroanat*. 1996;10:11-8.

- Marco E, Duarte E, Vila J, Tejero M, Guillen A, Boza R et al. Is botulinum toxin type A effective in the treatment of spastic shoulder pain in patients after stroke? A double-blind randomized clinical trial. *J Rehabil Med.* 2007;39:440-7.
- Marsala J, Lukacova N, Sulla I, Wohlfahrt P, Marsala M. The evidence for nitric oxide synthase immunopositivity in the monosynaptic Ia-motoneuron pathway of the dog. *Exp Neurol.* 2005;195:161-78.
- Marsala J, Lukacova N, Kolesar D, Kucharova K, Marsala M. Nitrergic proprioceptive afferents originating from quadriceps femoris muscle are related to monosynaptic Ia-motoneuron stretch reflex circuit in the dog. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;26:1387-412.
- Marsh SJ, Stansfeld CE, Brown DA, Davey R, McCarthy D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-type neurons and their axons in vitro. *Neuroscience.* 1987;23:275-89.
- Marshall KW, Theriault E, Homonko DA. A single capsaicin injection partially depletes neuropeptides but does not ameliorate inflammation severity in established feline antigen induced arthritis. *J Rheumatol.* 1997;24:1765-8.
- Martin S, Boisclair J, Konar M, Spreng D, Lang J. MRI characteristics and histology of bone marrow lesions in dogs with experimentally induced osteoarthritis. *Vet Radiol Ultrasound.* 2007;48:105-12.
- McKenzie JL, Fabre JW. Studies with a monoclonal antibody on the distribution of Thy-1 in the lymphoid and extracellular connective tissues of the dog. *Transplantation.* 1981;31:275-82.
- McNamara PS, Barr SC, Erb HN. Hematologic, hemostatic, and biochemical effects in dogs receiving an oral chondroprotective agent for thirty days. *Am J Vet Res.* 1996;57:1390-4.
- Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science.* 1965;150:971-9.
- Mille-Hamard L, Bauchet L, Baillet-Derbin C, Horvat JC. Estimation of the number and size of female adult rat C4, C5 and C6 dorsal root ganglia (DRG) neurons. *Somatosens Mot Res.* 1999;16:223-8.
- Millis DL. Die ganzheitliche Behandlung von Arthrose Patienten. *Prakt Tierarzt.* 2002;83:770-8.
- Mitchell BD, Emsley JG, Macklis JD. Stereotaxic Microneurosurgery in the Rodent: Methods and Applications Course Syllabus. Harvard Center for Neurodegeneration and Repair, Harvard Medical School Boston, MA USA 2001.
- Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J et al. Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol.* 1994;113:1008-14.

- Mohr W. Gelenke, Sehnen und Sehnengleitgewebe, Bursen, Faszien. In: Remmele W, Hrsg. Pathologien 5. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1997.
- Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ et al. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell*. 2002;9:229-31.
- Morris RJ, Mancini PE, Pfeiffer SE. Thy-1 cell surface antigen on cloned nerve cell lines of the rat and mouse: amount, location and origin of the antigen on the cells. *Brain Res*. 1980;182:119-35.
- Morris RJ, Ritter MA. Association of thy-1 cell surface differentiation antigen with certain connective tissues in vivo. *Cell Tissue Res*. 1980;206:459-75.
- Moskowitz RW, Goldberg VM. Studies of osteophyte pathogenesis in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1987;14:311-20.
- Mroz PJ, Silbert JE. Effects of [3H]glucosamine concentration on [3H]chondroitin sulphate formation by cultured chondrocytes. *Biochem J*. 2003;376:511-5.
- Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Structure and function of synoviocytes. In: Koopman WJ, Hrsg. Arthritis and allied conditions. Baltimore: Williams&Wilkins; 1997.
- Murphy KJ, Mann NJ, Sinclair AJ. Fatty acid and sterol composition of frozen and freeze-dried New Zealand Green Lipped Mussel (*Perna canaliculus*) from three sites in New Zealand. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2003;12:50-60.
- Murphy KJ, Travers P, Walport M. Janeway Immunologie. 7 Aufl. Spektrum akademischer Verlag; 2009.
- Myers SL, Brandt KD, O'Connor BL, Visco DM, Albrecht ME. Synovitis and osteoarthritic changes in canine articular cartilage after anterior cruciate ligament transection. Effect of surgical hemostasis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1406-15.
- Nagy JJ, Iversen LL, Goedert M, Chapman D, Hunt SP. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J Neurosci*. 1983;3:399-406.
- Nakayama K, Masuko S, Tsuruta T, Kutsuna T, Watanabe H. Vascularization and innervation of the canine wrist joint synovial membrane. *Tohoku J Exp Med*. 1995;175:195-209.
- Nägeli H, Althaus FR. Toxikologie. In: Frey HH, Löscher W, Hrsg. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 3. Aufl. Enke Verlag; 2010. S. 599-648.
- Neil KM, Caron JP, Orth MW. The role of glucosamine and chondroitin sulfate in treatment for and prevention of osteoarthritis in animals. *J Am Vet Med Assoc*. 2005;226:1079-88.

- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band I. 6 Aufl. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg; 1992.
- Nielsen K, Boston RS. Ribosome-inactivating proteins: A Plant Perspective. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001;52:785-816.
- Novikova L, Novikov L, Kellerth JO. Persistent neuronal labeling by retrograde fluorescent tracers: a comparison between Fast Blue, Fluoro-Gold and various dextran conjugates. *J Neurosci Methods.* 1997;74:9-15.
- O'Connor BL, Palmoski MJ, Brandt KD. Neurogenic acceleration of degenerative joint lesions. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67:562-72.
- O'Connor BL, Visco DM, Heck DA, Myers SL, Brandt KD. Gait alterations in dogs after transection of the anterior cruciate ligament. *Arthritis Rheum.* 1989;32:1142-7.
- O'Connor BL, Visco DM, Brandt KD. The development of experimental osteoarthritis in dogs with extensively deafferented knee joints. *Arthritis Rheum.* 1989;31:106.
- O'Connor BL, Brandt KD. Neurogenic factors in the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1993;19:581-605.
- Ogilvy CS, Borges LF. A quantitative analysis of the retrograde axonal transport of 4 different fluorescent dyes in peripheral sensory and motor neurons and lack of anterograde transport in the corticospinal system. *Brain Res.* 1988;475:244-53.
- Olsnes S, Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry.* 1973;12:3121-6.
- Olsson S-E. Osteochondritis in the dog. *Proceedings American Animal Hospital Association.* 1975;42:362.
- Olsson S-E. Pathophysiology, morphology and clinical signs of osteochondrosis (chondrosis) in the dog. In: Bojrab MJ, Hrsg. *Disease mechanisms in small animal surgery.* Verlag Lea and Febiger; 1993. S. 777-89.
- Pan HL, Chen SR. Sensing tissue ischemia: another new function for capsaicin receptors? *Circulation.* 2004;110:1826-31.
- Payne-Johnson. Determination of the efficacy and safety of mavacoxib tablets administered monthly at 2 mg/kg bw in the treatment of pain and inflammation associated with osteoarthritis in dogs. *Small animal veterinary association* 2009.

- Pedersen NC, Pool RR, Morgan JP. Joint diseases in dogs and cats. In: Ettinger SJ, Hrsg. Textbook of veterinary internal medicine Bd.3: Diseases of the dog and cat. Philadelphia, London: Saunders; 1989. S. 263-77.
- Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Ghandur-Mnaymneh L, Howell DS, Woessner JF, Jr. Role of synovial membrane inflammation in cartilage matrix breakdown in the Pond-Nuki dog model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1985;28:554-61.
- Petrides PE. Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides PE, Hrsg. Biochemie und Pathobiochemie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1997. S. 734-59.
- Phelps PT, Anthes JC, Correll CC. Cloning and functional characterization of dog transient receptor potential vanilloid receptor-1 (TRPV1). *Eur J Pharmacol.* 2005;513:57-66.
- Polydefkis M, Griffin JW, McArthur J. New insights into diabetic polyneuropathy. *JAMA- J Am Med Assoc.* 2003;290:1371-6.
- Pommer A. X-ray therapy in veterinary medicine. *Advances in veterinary science.* Academic Press Inc , Publishers New York, London. 1958;4.
- Pont S. Thy-1: a lymphoid cell subset marker capable of delivering an activation signal to mouse T lymphocytes. *Biochimie.* 1987;69:315-20.
- Poole CA. The structure and function of articular cartilage matrix. In: Woessner JF, Howell DS, Hrsg. Joint cartilage degeneration. New York: Marcel Dekker; 1993. S. 121.
- Pover CM, Barnes MC, Coggeshall RE. Do primary afferent cell numbers change in relation to increasing weight and surface area in adult rats? *Somatosens Mot Res.* 1994;11:163-7.
- Purkiss J, Welch M, Doward S, Foster K. Capsaicin-stimulated release of substance P from cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of two distinct mechanisms. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:1403-6.
- Raff MC, Fields KL, Hakomori SI, Mirsky R, Pruss RM, Winter J. Cell-type-specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.* 1979;174:283-308.
- Rapp DE, Turk KW, Bales GT, Cook SP. Botulinum toxin type a inhibits calcitonin gene-related peptide release from isolated rat bladder. *J Urol.* 2006;175:1138-42.
- Read RA. Osteochondrose und Ellbogenarthrose bei jungen Hunden: Häufigkeit, Diagnose und Therapie. *Waltham International Focus.* 1993;3:2-10.

- Reif AE, Allen JM. The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. *J Exp Med.* 1964;120:413-33.
- Reimann I, Christensen SB. A histological demonstration of nerves in subchondral bone. *Acta Orthop Scand.* 1977;48:345-52.
- Resnick D. *Diagnosis of bone and joint disorders.* Philadelphia: Saunders; 1995.
- Richmond FJ, Gladdy R, Creasy JL, Kitamura S, Smits E, Thomson DB. Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *J Neurosci Methods.* 1994;53:35-46.
- Saker KE, Eddy AL, Thatcher CD, Kalnitsky J. Manipulation of dietary (n-6) and (n-3) fatty acids alters platelet function in cats. *J Nutr.* 1998;128:2645S-7S.
- Salo PT, Theriault E. Number, distribution and neuropeptide content of rat knee joint afferents. *J Anat.* 1996;190 (Pt 4):515-22.
- Salo PT, Theriault E, Wiley RG. Selective ablation of rat knee joint innervation with injected immunotoxin: a potential new model for the study of neuropathic arthritis. *J Orthop Res.* 1997;15:622-8.
- Salo PT, Hogervorst T, Seerattan RA, Rucker D, Bray RC. Selective joint denervation promotes knee osteoarthritis in the aging rat. *J Orthop Res.* 2002;20:1256-64.
- Salomon FV, Geyer H, Gille U. *Anatomie für die Tiermedizin.* 2 Aufl. Enke Verlag; 2008.
- Samoy Y, Van RB, Gielen I, Walschot N, van BH. Review of the literature: elbow incongruity in the dog. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2006;19:1-8.
- Samuel EP. The innervation and sensitivity of the articular capsule of the human and feline knee joint. M D Thesis Victoria University, Manchester. 1949.
- Samuel EP. The autonomic and somatic innervation of the articular capsule. *Anat Rec.* 1952;113:53-70.
- Sanderson RO, Beata C, Flipo RM, Genevois JP, Macias C, Tacke S et al. Systematic review of the management of canine osteoarthritis. *Vet Rec.* 2009;164:418-24.
- Sandvig K, van Deurs. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 2002;529:49-53.
- Schaible HG, Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain.* 1993;55:5-54.
- Schaible HG. Spinal mechanisms contributing to joint pain. In: Anon. *Osteoarthritic joint pain.* John Wiley and Sons; 2004. S. 4-27.

- Schaible HG, Schmelz M, Tegeder I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58:323-42.
- Schaible HG, Richter F, Ebersberger A, Boettger MK, Vanegas H, Natura G et al. Joint pain. *Exp Brain Res.* 2009;196:153-62.
- Schantz EJ, Johnson EA. Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine. *Microbiol Rev.* 1992;56:80-99.
- Schmalbruch H. The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. *Anat Rec.* 1987;219:315-22.
- Schmidt RF. The articular polymodal nociceptor in health and disease. *Prog Brain Res.* 1996;113:53-81.
- Schmidt RF, Thews G, Lang F. *Physiologie des Menschen.* 28 Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer Verlag; 1999.
- Schmidt RF. Die Physiologie des Schmerzes. *Pharmazie in unserer Zeit.* 2002;31:23-30.
- Schmued LC, Fallon JH. Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res.* 1986;377:147-54.
- Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J Histochem Cytochem.* 1999;47:719-30.
- Schrager M. Slimming down reduces arthritis risk. *Physician and Sportsmedicine.* 1995.
- Schulz LC, Dämmrich K. Gelenke. In: Schulz LC, Hrsg. *Pathologie der Haustiere. Teil I Organveränderungen.* Jena: Gustav-Fischer Verlag; 1991. S. 748-50.
- Schünke M. *Diarthrosen, Topographie und Funktion des Bewegungssystems.* 1 Aufl. Thieme Verlag; 2001.
- Seil O, Choi EK, Choi YS. Short-term autonomic denervation of the atria using botulinum toxin. *The Korean society of cardiology.* 2010.
- Setnikar I, Rovati LC. Absorption, distribution, metabolism and excretion of glucosamine sulfate. A review. *Arzneimittelforschung.* 2001;51:699-725.
- Sevalla K, Todhunter RJ, Vernier-Singer M, Budsberg SC. Effect of polysulfated glycosaminoglycan on DNA content and proteoglycan metabolism in normal and osteoarthritic canine articular cartilage explants. *Vet Surg.* 2000;29:407-14.
- Shi TJ, Tandrup T, Bergman E, Xu ZQ, Ulfhake B, Hokfelt T. Effect of peripheral nerve injury on dorsal root ganglion neurons in the C57 BL/6J mouse: marked changes both in cell numbers and neuropeptide expression. *Neuroscience.* 2001;105:249-63.

- Simkin PA. Synovial physiology. In: Koopman WJ, Hrsg. Arthritis and allied conditions. 13. Aufl. Williams&Wilkins; 1997.
- Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56:387-437.
- Simone DA, Nolano M, Johnson T, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. *J Neurosci.* 1998;18:8947-59.
- Sims TJ, Gilmore SA. Regeneration of dorsal root axons into experimentally altered glial environments in the rat spinal cord. *Exp Brain Res.* 1994;99:25-33.
- Singh JA. Botulinum toxin therapy for osteoarticular pain: an evidence-based review. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2010;2:105-18.
- Singh JA, Mahowald ML, Noorbaloochi S. Intraarticular botulinum toxin A for refractory painful total knee arthroplasty: a randomized controlled trial. *J Rheumatol.* 2010;37:2377-86.
- Smollich A. Kreislaufsystem. In: Smollich A, Michel G, Hrsg. Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 2. Aufl. Jena: Gustav-Fischer Verlag; 1992. S. 15-58.
- Staszyk C, Gasse H. Zur Innervation der Gelenkkapsel beim Hund, Teil 2: Ellbogengelenk. *Kleintierpraxis.* 1999;44:501-6.
- Stirpe F, Olsnes S, Pihl A. Gelonin, a new inhibitor of protein synthesis, nontoxic to intact cells. Isolation, characterization, and preparation of cytotoxic complexes with concanavalin A. *J Biol Chem.* 1980;255:6947-53.
- Stirpe F. Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon.* 2004;44:371-83.
- Stockwell RA. Biology of cartilage cells. London: Cambridge University Press; 1979.
- Strusberg I, Mendelberg RC, Serra HA, Strusberg AM. Influence of weather conditions on rheumatic pain. *J Rheumatol.* 2002;29:335-8.
- Sturge RA, Yates DB, Gordon D, Franco M, Paul W, Bray A et al. Prostaglandin production in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1978;37:315-20.
- Suri S, Gill SE, Massena de CS, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA. Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:1423-8.

- Suter E, Herzog W, Leonard TR, Nguyen H. One-year changes in hind limb kinematics, ground reaction forces and knee stability in an experimental model of osteoarthritis. *J Biomech.* 1998;31:511-7.
- Szentkuti L. Muskelphysiologie. In: Engelhardt W, Brewes G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere.* Enke Verlag; 2000. S. 112-35.
- Tacke S. Möglichkeiten und Grenzen der klinischen Algesimetrie unter besonderer Berücksichtigung der präemptiven und postoperativen Schmerztherapie beim Hund [Habilschr. med. vet] Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2003.
- Takahashi K, Hashimoto S, Kubo T, Hirasawa Y, Lotz M, Amiel D. Hyaluronan suppressed nitric oxide production in the meniscus and synovium of rabbit osteoarthritis model. *J Orthop Res.* 2001;19:500-3.
- Tamura R, Hanesch U, Schmidt RF, Kumazawa T, Mizumura K. Examination of colocalization of calcitonin gene-related peptide- and substance P-like immunoreactivity in the knee joint of the dog. *Neurosci Lett.* 1998;254:53-6.
- Tewksbury JJ, Levey DJ, Huizinga M, Haak DC, Traveset A. Costs and benefits of capsaicin-mediated control of gut retention in dispersers of wild chilies. *Ecology.* 2008;89:107-17.
- Tsai EC, van Bendegem RL, Hwang SW, Tator CH. A novel method for simultaneous anterograde and retrograde labeling of spinal cord motor tracts in the same animal. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:1111-22.
- Tulamo RM, Houttu J, Tupamaki A, Salonen M. Hyaluronate and large molecular weight proteoglycans in synovial fluid from horses with various arthritides. *Am J Vet Res.* 1996;57:932-7.
- Ungemach FR. Pharmaka zur Beeinflussung von Entzündungen. In: Löscher W, Ungemach FR, Kroker R, Hrsg. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.* 6. Aufl. Parey Verlag; 2003.
- Van den Berg F. *Angewandte Physiologie.* Georg Thieme Verlag; 2003.
- Van Sickle DC. Ununited anconeal process. *Am Animal Hosp Assoc.* 1975;12.
- Vervuert I. Helfen Chondroprotektiva dem alten Hund wieder auf die Beine. *Proceedings des 4. Leipziger Tierärztekongresses; 2008 17.-19.Januar; Leipzig*
- Wang X, Hu W, Cao Y, Yao J, Wu J, Gu X. Dog sciatic nerve regeneration across a 30-mm defect bridged by a chitosan/PGA artificial nerve graft. *Brain.* 2005;128:1897-910.
- Watt I. Arthrose-eine oder viele Erkrankungen. *Radiologe.* 2000;40:1134-40.
- Wessendorf MW. Fluoro-Gold: composition, and mechanism of uptake. *Brain Res.* 1991;553:135-48.

- Wiley RG, Stirpe F, Thorpe P, Oeltmann TN. Neuronotoxic effects of monoclonal anti-Thy 1 antibody (OX7) coupled to the ribosome inactivating protein, saporin, as studied by suicide transport experiments in the rat. *Brain Res.* 1989;505:44-54.
- Wiley RG, Kline IV RH. Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J Neurosci Methods.* 2000;103:73-82.
- Wiley RG, Lappi DA. Targeted toxins in pain. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:1043-54.
- Williams DJ, Vandenberg P, Prockop DJ. Collagen and elastin. In: Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Hrsg. *Textbook of Rheumatology.* 5. Aufl. Philadelphia: W.B. Saunders; 1997.
- Winhart S. Zur Fraktur des Processus coronoideus medialis beim Hund [Dissertation med. vet] München: Universität München; 1991.
- Wyke B. The neurology of joints. A review of general principles. *Clin Rheum Dis.* 1981;223-39.
- Yarbrough T. Slow-acting, Disease-modifying drugs for treatment of osteoarthritis. In: Robinson NE, Hrsg. *Current therapy in equine medicine.* 5. Aufl. Saunders; 2003. S. 14-6.
- Yasui T, Akatsuka M, Tobetto K, Hayaishi M, Ando T. The effect of hyaluronan on interleukin-1 alpha-induced prostaglandin E2 production in human osteoarthritic synovial cells. *Agents Actions.* 1992;37:155-6.
- Yuan RY, Sheu JJ, Yu JM, Chen WT, Tseng IJ, Chang HH et al. Botulinum toxin for diabetic neuropathic pain: a randomized double-blind crossover trial. *Neurology.* 2009;72:1473-8.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Johannes Seeger für die Vermittlung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas und die Betreuung während meiner Arbeit im Veterinär - Anatomischen Institut der Universität Leipzig ganz herzlich bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Böttcher für die engmaschige Betreuung meiner Arbeit inklusive der unermüdlichen Beantwortung meiner zahllosen Emails.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Johannes Kacza für die vielen wertvollen Ratschläge und die geduldige und umsichtige Unterstützung in allen Technik- und Computerfragen.

Frau Gabrielle Lindner, Frau Susanne Kauschke, Herrn Mario Reinhard und Frau Franziska Gröllich danke ich für die nette labortechnische und auch moralische Unterstützung.

Für die großartige Unterstützung bei der Klärung vieler offener Fragen bezüglich des Versuches und die unermüdliche Hilfe möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Härtig bedanken.

Herrn Prof. Dr. Herbert Fuhrmann möchte ich für die Durchführung des Lipidnachweises danken.

Ein großes Dankeschön geht nochmals an alle Mitarbeiter des Veterinär-Anatomischen Instituts für das tolle Arbeitsklima, die vielen aufmunternden Worte und den guten Zusammenhalt.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern für ihre vorbehaltlose Unterstützung in allen Lebenslagen und das Vertrauen, welches sie in mich haben.

Meinem Freund Sven danke ich sehr für seine Geduld und seine Liebe auch in schwierigen Phasen.